

**Analyse von Cathepsin K- Ligand-
Wechselwirkungen:
Vorarbeiten zur Untersuchung der Propeptid-
katalysierten Faltung dieses Enzyms**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich- Schiller- Universität Jena

von Ramona Kleint,
geboren am 07.07.1979 in Sonneberg

Gutachter 1: Prof. Dr. B. Wiederanders

Gutachter 2: Prof. Dr. J. Lasch

Gutachter 3: Prof. Dr. R. Klinger

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.04.2005

Abkürzungsverzeichnis

AMC	Aminomethylcoumarin
APS	Amoniumpersulfat
Arg	Arginin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamidtetraazetat
EI-Komplex	Enzym- Inhibitor- Komplex
ER	Endoplasmatisches Retikulum
kDa	Kilodalton
Leu	Leucin
MTP	Mikrotiterplatte
NaAz	Natriumazetat
NaPa	Natriumphosphat
NaZi	Natriumziträt
OPA	Orthophthaldialdehyd
PBS	Phosphat- gepufferte Kochsalzlösung
Phe	Phenylalanin
POD	Peroxidase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Val	Valin
V- MTP	V- Mikrotiterplatten

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Zusammenfassung	1
1. Einleitung	3
2. Materialien und Methoden	8
2.1. Materialien	8
2.1.1. Reagenzien	8
2.1.2. Enzymaktivitätsmessungen	9
2.1.3. SDS- Elektrophorese	9
2.1.4. Western- Blot	9
2.1.5. Geräte	9
2.1.6. Computerprogramme	10
2.2. Methoden	10
2.2.1. Messung der Cathepsin K- Aktivität	10
2.2.1.1. Fluorometrische Messung mit AMC- Substraten	10
2.2.1.2. Photometrische Messung mit AMC- Substraten	11
2.2.2. Bestimmung der kinetischen Konstanten für die Reaktion von Cathepsin K mit Substraten und seinem Propeptid	11
2.2.2.1. Cathepsin K und seine Substrate	11
2.2.2.2. Cathepsin K und sein Propeptid	14
2.2.3. Cathepsin K- Konzentrationsbestimmung durch E 64- Titration	15
2.2.4. SDS- Gelelektrophorese	17
2.2.5. Färbung von Polyacrylamidgelen	17
2.2.6. Western- Blot	18
2.2.7. Azocasein- Verdauung	18
2.2.8. Aminogruppenbestimmung nach YEMM und COCKING	19
2.2.9. Aminogruppenbestimmung mit der Orthophthal-dialdehyd- (OPA) methode	20
2.2.10. Diafiltration des Cathepsin K- Propeptids mit MICROCON®- Hülsen	20
2.2.11. Abbau des Cathepsin K- Propeptids durch Cathepsin K	21
2.2.12. Abbau des Cathepsin K- Propeptids mit Pepsin	21
3. Zielstellung	23

4. Ergebnisse	25
4.1. Charakterisierung der Cathepsin K- Charge	25
4.2. Optimierung des fluorometrischen Tests zur Cathepsin K- Bestimmung	26
4.3. Nachweis von renaturiertem Cathepsin K im Komplex mit dem inhibierenden Propeptid ohne separaten Trennschritt	46
4.3.1. pH- Abhängigkeit der Inhibition des Cathepsin K durch sein Propeptid	46
4.3.2. Testung von Protein- Substraten zur Cathepsin K- Aktivitätsbestimmung	53
4.3.2.1. Azocasein	53
4.3.2.2. Natürliche Protein- Substrate	54
4.4. Nachweis von renaturiertem Cathepsin K nach Trennung vom inhibierenden Propeptid	60
4.4.1. Abtrennung des Propeptids vom reifen Enzym durch Diafiltration	60
4.4.2. Verfahren zur spezifischen Zerstörung des Propeptids	61
4.4.2.1. Abbau des Cathepsin K- Propeptids durch Cathepsin K	61
4.4.2.2. Spezifischer proteolytischer Abbau des Propeptids	63
5. Diskussion	68
6. Literaturverzeichnis	81

Zusammenfassung

Die ähnlich strukturierten Cysteinproteasen der Papain- Superfamilie werden alle als inaktive Proenzyme synthetisiert, 38 bis 251 Aminosäuren lange Proregionen blockieren die katalytische Aktivität. So große Strukturunterschiede der Proregion lassen Funktionsunterschiede vermuten. Für die Cathepsine L und S wurde schon bewiesen, dass ihre etwa 100 Aminosäuren langen Proregionen essentiell für die korrekte Faltung der reifen Enzyme sind, also eine sogenannte Foldasefunktion erfüllen. Die Proregionen der Cathepsine B und X sind deutlich kürzer und erfüllen die in der Literatur definierten strukturellen Kriterien einer Foldase nicht. Es ist zwar bekannt, dass selbst bei nahe verwandten Proteinen unterschiedliche Faltungskinetiken zur Ausbildung der reifen Proteinstruktur führen können, Beispiele dafür, dass selbst innerhalb einer Enzymfamilie so grundsätzlich verschiedene Mechanismen wie Spontan- und Foldase- katalysierte Faltung vorkommen, sind bisher aber noch nicht publiziert worden.

Procathepsin K hat eine 99 Aminosäuren lange Proregion, vergleichbar mit den beiden genannten Foldasen aus der Cathepsin L- ähnlichen Unterfamilie, so dass angenommen werden kann, dass auch die Faltung dieser Cysteinprotease Proregion- katalysiert erfolgt. Die Charakterisierung dieses Prozesses *in- vitro* lässt Rückschlüsse über die Spezifität der Foldasefunktion von Propeptiden zu, ein Forschungsgebiet, zu dem bisher ebenfalls noch nicht publiziert wurde. Das in den letzten Jahren rapide gestiegene Interesse an Cathepsin K liegt an seiner *in- vivo* Funktion und möglichen Beteiligung an pathologischen Prozessen, insbesondere der Rheumatoiden Arthritis und Osteoporose. Die Fokussierung auf klinische Fragestellungen hat zu einer vergleichsweise geringen Anzahl an Publikationen zu elementaren molekularen und kinetischen Eigenschaften dieses Enzyms geführt.

Ausgehend von Literaturdaten zum Cathepsin K und Erfahrungen in unserer Arbeitsgruppe zur Renaturierung von denaturiertem Cathepsin S begannen wir mit methodischen Vorarbeiten zum Nachweis der Foldasefunktion für das Propeptid des Cathepsin K. Wir suchten nach einem empfindlichen enzymatischen Nachweisverfahren für das durch Propeptidzusatz renaturierte Enzym und wollten die Hemmwirkung des Propeptides auf die Enzymaktivität in bewährter Weise durch pH- Wert- Senkung eliminieren. Nachdem es trotz sorgfältiger experimenteller Bemühungen nicht gelang, die zur pH- Abhängigkeit der Propeptidhemmung von Cathepsin K publizierten Daten zu reproduzieren und bei diesen Experimenten auch noch festgestellt wurde, dass das üblicherweise zur Aktivitätsmessung benutzte fluorogene Substrat Z-Phe-Arg-AMC eine erhebliche Substrathemmung zeigt, wurde die zuverlässige Messung der Cathepsin K- Aktivität unter Renaturierungsbedingungen das Thema der Arbeit. Wir

optimierten die Testbedingungen für den fluorometrischen Standardtest und charakterisierten die drei besten AMC- Substrate des Cathepsin K bezüglich K_M , K_i und k_{cat} . Dazu wurden zwei unterschiedliche methodische Ansätze genutzt, Messung von Anfangsgeschwindigkeiten bzw. Auswertung von Progresskurven bei Totalhydrolyse des Substrates, und prinzipiell übereinstimmende Ergebnisse erzielt. Da diese Untersuchungen nicht nur für die eigene Arbeitsgruppe, sondern von genereller Bedeutung sind, wird das Phänomen der Substrathemmung ausführlich diskutiert. Die Messungen der Inhibition von Cathepsin K durch sein Propeptid zeigten nur eine geringe pH- Abhängigkeit, selbst bei pH 4,0 lag der K_i noch im unteren nanomolaren Bereich. Diesbezüglich ist das Enzym eine Ausnahme in der Familie der Papainähnlichen Cysteinproteasen. Möglichen Ursachen der Diskrepanz zwischen den eigenen und den Literaturdaten wurde nachgegangen.

Um die biologische Wirksamkeit des durch Propeptidzusatz renaturierten Cathepsin K zeigen zu können, mussten also andere Verfahren gesucht werden. Geprüft wurde der Einsatz von natürlichen Proteinsubstraten und von Verfahren, die vor der Aktivitätsmessung des Enzyms das inhibitorische Propeptid aus der Probe entfernen, das waren die Trennung unter Nutzung der Molekulargewichtsunterschiede zwischen Enzym und Propeptid und der auto- oder heterokatalytische Abbau des Propeptids. Proteinsubstrate, die von Cathepsin K mit so hoher Affinität wie das Propeptid gebunden und rasch umgesetzt werden, wurden nicht gefunden. Letztlich erwies sich die heterokatalytische Zerstörung des Cathepsin K- Propeptids mit Pepsin als das günstigste Verfahren, es ist einfach und reproduzierbar. Es wird inzwischen erfolgreich bei der Bearbeitung der eingangs dargestellten Fragestellung genutzt.

1. Einleitung

Cathepsin K ist eine lysosomale Protease, die als Prä- Proenzym synthetisiert wird. Die Präsequenz dirigiert das entstehende Protein ins Lumen des ER, die Prosequenz sorgt während der ersten Schritte der intrazellulären Zielsteuerung für die Blockierung der proteolytischen Aktivität, eine allen Endopeptidasen eigene Eigenschaft. Aufgrund des Cystein- Restes im katalytischen Zentrum wird Cathepsin K der Klasse der Cysteinproteasen zugeordnet. Wegen der dreidimensionalen Struktur des reifen Enzyms - zwischen zwei etwa gleich großen Domänen befindet sich die Substratbindungsstelle, das aktive Zentrum - gehört Cathepsin K zur Papain- Superfamilie. Diese umfasst gegenwärtig drei Unterfamilien, Cathepsin L- ähnliche (z.B. Cathepsin L, K, S und H), Cathepsin F- ähnliche (Cathepsin F und W) und Cathepsin B- ähnliche Endopeptidasen. Die Unterteilung in diese drei Familien beruht auf der Größe und Struktur der Proregion (Karrer, Peiffer et al. 1993; Wang, Shi et al. 1998; Wex, Levy et al. 1999).

Bei Säugetieren wurden Cysteinproteasen zuerst in den Lysosomen gefunden. Sie gehören also zu den Cathepsinen, die für den allgemeinen intrazellulären Proteinabbau verantwortlich sind. Inzwischen kennt man aber auch schon zahlreiche spezifische Funktionen dieser Proteasen bei ganz unterschiedlichen physiologischen und pathologischen Prozessen. Cathepsin K ist beispielsweise die einzige Cysteinprotease, die tripelhelikales Kollagen spalten kann. Es wird in hohem Maße in Osteoklasten exprimiert (Brömme and Okamoto 1995; Drake, Dodds et al. 1996). Seine Schlüsselrolle beim Abbau des Typ 1 Kollagens des Knochens wird durch pathobiochemische Beobachtungen am Menschen und durch Tierexperimente belegt (Garnero, Borel et al. 1998; Kafienah, Brömme et al. 1998; Atley, Mort et al. 2000). Mutationen im Cathepsin K- Gen führen unter anderem zu Pyknodysostose und Skelett-Dysplasien (Gelb, Shi et al. 1996; Hou, Brömme et al. 1999; Fujita, Nakata et al. 2000). Cathepsin K knock- out Mäuse zeigten einen gestörten Abbau von Knochen und entwickelten Osteopetrose (Gowen, Lazner et al. 1999). Bei Rheumatoider Arthritis findet man das Enzym in Synovia- Fibroblasten auf der Seite der Knochenresorption, so dass es für die typischen Destruktionen verantwortlich sein könnte (Hou, Li et al. 2002). Aufgrund der Option der Therapie von Erkrankungen mit Cathepsin K- Überfunktion (z. B. Rheumatoide Arthritis) ist es naheliegend, dass an der Entwicklung spezifischer und pharmakologisch nutzbarer Inhibitoren für dieses Enzyms intensiv gearbeitet wird.

Wie auch die anderen Mitglieder der Papain- Familie wird Cathepsin K als inaktives Precursor- Protein synthetisiert, bei welchem die N- terminale Proregion zunächst kovalent mit den beiden Domänen der Enzymregion verbunden ist und so die Anlagerung des

Substrates an das aktive Zentrum verhindert. Die Prozessierung des Zymogens zum aktiven Enzym erfolgt durch Abspaltung der Pro- Region auf dem Weg vom Golgi- Feld zu den Lysosomen, ausgelöst durch den sinkenden pH in den entsprechenden Vesikeln und der damit verbundenen Konformationsänderung, die den Inhibitor zum Substrat macht.

Liegt die Proregion im freien, nicht- kovalent gebundenen Zustand vor, so spricht man vom Propeptid. Die Tatsache, dass Propeptide in sogenannten „*trans*“- Experimenten ihre Mutterenzyme hochaffin in Ein- Schritt- Reaktionen hemmen, spricht dafür, dass die Propeptide auch in freier Form ähnlich wie im Zymogen strukturiert sind. Dafür gibt es auch noch weitere indirekte Hinweise, z. B. CD und endogene Tryptophanfluoreszenzmessungen (Fox, de Miguel et al. 1992; Li, Hu et al. 1995; Maubach, Schilling et al. 1997; Billington, Mason et al. 2000). Ein schlüssiger Nachweis durch NMR oder Röntgenstrukturanalyse steht aber noch aus (Kaulmann 2002). Eine spontane, von der Anwesenheit des Enzyms unabhängige Strukturierung der Proregion wird in der Literatur als Voraussetzung für eine weitere Funktion, die Foldasewirkung angesehen. Foldasen sind, ähnlich wie Chaperone, an der Ausbildung der nativen Struktur von Proteinen beteiligt. Während Chaperone unspezifische Faltungshilfen sind, ist Spezifität das Charakteristikum der Foldasen, die anfänglich auch als „intramolekulare Chaperone“ bezeichnet wurden (Vijayalakshmi, Mukherjee et al. 2001). Oft sind Proregionen solche spezifischen Faltungskatalysatoren ihrer Mutterenzyme. *Per definitionem* wird Faltungshilfe durch eine kovalent gebundene Proregion als *cis*- und durch ein isoliertes Propeptid als *trans*- Reaktion bezeichnet.

Die folgenden Beispiele aus der Literatur sollen den gegenwärtigen Kenntnisstand illustrieren. Die detailliertesten Untersuchungen bezüglich des Mechanismus der Propeptid-katalysierten Proteinfaltung existieren für Subtilisin und α - lytische Protease, zwei bakterielle Serinproteinasen. In beiden Fällen wurden im Vorläufermolekül Abschnitte gefunden, die sofort nach Abschluss der Faltung von der Proteinase abgebaut werden, ohne die aber die Faltung des reifen Enzyms auf einer intermediären Stufe stehen bleibt (Inouye 1991). Diese Faltungsintermediate sind sogenannte „molten globules“; sie besitzen bereits die charakteristische Sekundärstruktur der reifen Enzyme, aber nur eine lockere, unvollständige Tertiärstruktur. Die Umwandlung in die kompakte reife Konformation findet spontan nur extrem langsam statt. Erst durch die Ausbildung des spezifischen Komplexes mit der Proregion wird die hohe energetische Barriere auf dem Weg zur aktiven Konformation so weit reduziert, dass die Reaktionsgeschwindigkeit mit den üblichen Techniken messbar wird (Eder, Rheinhecker et al. 1993; Sohl, Jaswal et al. 1998). Am Beispiel des Subtilisin wurde gezeigt, dass es durch Kontakt mit der Proregion zu einer Stabilisierung eines Helix- Faltblatt-

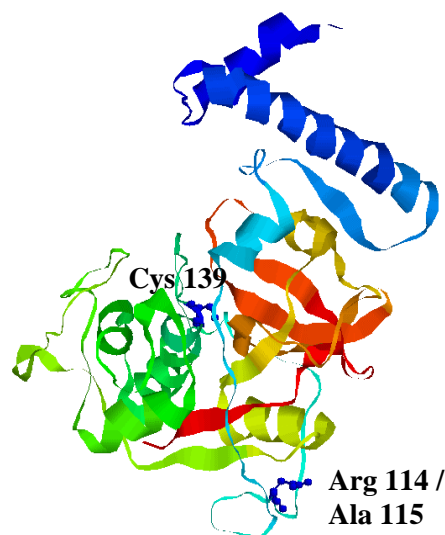
Helix Motifs des Enzyms kommt, das dann wiederum als Nukleationskern für die angrenzenden Bereiche fungiert (Wang, Ruvinov et al. 1995). Ähnlich wie beim Cathepsin K ist auch beim Subtilisin das Propeptid ein hochaffiner Inhibitor des Mutterenzyms. Inhibitoren ohne strukturelle Gemeinsamkeiten mit der Proregion führten nicht zur korrekten Faltung des Enzyms (Bartlett and Marlowe 1987). Damit wurde gezeigt, dass die Foldasefunktion der Proregion nicht einfach auf die Besetzung der Substratbindungsstelle zurückzuführen ist (Bryan, Wang et al. 1995; Shinde and Inouye 1996).

α -lytische Protease ist ein Enzym mit einem überdurchschnittlich hohen Glycinanteil von 16 % (Sohl, Jaswal et al. 1998; Cunningham, Jaswal et al. 1999). Das ermöglicht einerseits eine hohe Flexibilität der entfalteten Proteinkette, andererseits kommt es bei der Faltung zur Ausbildung sehr kurzer Schleifen, die eine sehr kompakte native Struktur bedingen. Allerdings verläuft die Faltung des Vorläufers bis zur Ausbildung des aktiven Zentrums nur in Anwesenheit der Proregion. Vor Erreichen der finalen Konformation der Enzymdomäne wird dann die Proregion abgespalten, der frei gewordene N- Terminus des Enzyms findet seine finale Konformation spontan (Sohl, Jaswal et al. 1998; Cunningham, Jaswal et al. 1999). In der Klasse der Cysteinproteasen gibt es bereits seit mehr als einem Jahrzehnt Hinweise auf die essentielle Rolle der Proregion bei der Faltung der katalytischen Domänen von Cathepsin L. In Untersuchungen mit in *E. coli* exprimiertem humanem Cathepsin L mit verkürzter beziehungsweise vollständig entfernter Proregion wurde festgestellt, dass sich dieses Enzym aus inclusion bodies im Vergleich zum Wildtyp schlecht, beziehungsweise gar nicht zurückfalten lässt. Dabei war der Aktivitätsverlust der Rückfaltungseffizienz proportional zur Deletionsgröße in der Proregion (Smith and Gottesman 1989). Diese Ergebnisse wurden durch Untersuchungen mit Cathepsin L aus Ratten bestätigt (Ogino, Kaji et al. 1999). *In- vivo* Versuche mit Cathepsin L, dessen eigene Proregion durch die einer verwandten Protease ersetzt wurde, führten zu einer Retention des Enzyms im ER, typisch für fehlgefaltete Proteine (Tao, Stearns et al. 1994). Für das mit dem Cathepsin L verwandte Cathepsin S sind solche Hinweise erst kürzlich von der eigenen Arbeitsgruppe, etwa zeitgleich mit dem direkten Beweis der Foldasefunktion des Propeptids, veröffentlicht worden. (Kreusch, Fehn et al. 2000; Schilling, Pietschmann et al. 2001; Pietschmann, Fehn et al. 2002).

Durch Röntgenstrukturanalyse wurde die dreidimensionale Struktur der Procathepsine L, K und S in den letzten Jahren aufgeklärt (Coulombe, Grochulski et al. 1996; Coulombe, Li et al. 1996; LaLonde, Zhao et al. 1999; Kaulmann 2002).

Das folgende Cartoon zeigt die Struktur des humanen Procathepsin K. N- terminal beginnt die Proregion mit einer $\alpha 1$ - Helix, die sich mit dem die Supersekundärstruktur überragenden Abschnitt der sich anschließenden $\alpha 2$ - Helix kreuzt und so das Rückrat einer kleinen Domäne bildet. Diese Prodomäne ist vermutlich nicht nur für die korrekte Positionierung des inhibierenden C- terminalen Teiles der Proregion verantwortlich, sondern könnte beispielsweise auch die Foldasefunktion realisieren.

Es schließt sich dann die sogenannte Supersekundärstruktur, bestehend aus einem Teil der $\alpha 2$ - Helix, einer Schleife und einem β - Faltblatt an. Die Supersekundärstruktur verankert den die Substratbindungsstelle blockierenden Teil der Proregion am Propeptid- bindenden Loop des Enzyms. Anschließend folgt die kurze $\alpha 3$ - Helix und der gestreckte C- terminale Teil der Proregion, der zwischen den beiden Domänen des reifen Enzyms liegt und so den Zugang des Substrates zum aktiven Zentrum blockiert. Da die Orientierung entgegengesetzt zum Substrat ist, kann keine Hydrolyse durch die katalytische Triade erfolgen. An das C- terminale Ende der Proregion schließt sich das N- terminale Ende des reifen Enzyms an.



Cartoon 1: Dreidimensionale Struktur von Procathepsin K:

Die auf Röntgenkristallstrukturdaten basierende Darstellung wurde der SWISS Prot Datenbank entnommen, die Nummerierung schließt die Signalsequenz ein. In der Proform befindet sich die 99 Aminosäuren lange Proregion (blau dargestellt) kovalent an den N-Terminus des Enzyms gebunden. Das C- terminale Ende der Proregion lagert zwischen den beiden Domänen des reifen Enzyms (grün bzw. orangerot dargestellt) und blockiert so das katalytische Zentrum. Hervorgehoben wurde Cystein 139 im katalytischen Zentrum sowie der Übergang von der Proregion zum reifen Enzym zwischen Arginin 114 und Alanin 115.

In der Cathepsin L- ähnlichen Unterfamilie der Papain- Familie wurde bisher kein Beispiel für die Spontanfaltung der reifen Enzyme gefunden, weder in *cis*- noch in *trans*- Experimenten. Es spricht also vieles dafür, dass es sich hier tatsächlich um eine generelle Eigenschaft der Mitglieder dieser Unterfamilie handelt. Auch beim Cathepsin K gibt es bereits indirekte Hinweise auf eine Faltungskatalyse durch die Proregion. In Familien mit Pyknodysostose wurde nach Ursachen der Krankheit auf molekulargenetischer Ebene gesucht. Dabei wurden neben mehreren Mutationen im reifen Cathepsin K auch Mutationen in der Proregion entdeckt, welche die Reifung des Zymogens zum aktiven Enzym verhindern (Hou, Brömme et al. 1999). Cathepsin K ist ein naher Verwandter des Cathepsin S (Inaoka, Bilbe et al. 1995; Bossard, Tomaszek et al. 1996; Lecaille, Kaleta et al. 2002), unterscheidet sich von ihm aber durch die Glykosylierung des reifen Enzyms (Brömme and Okamoto 1995). Kohlenhydratreste sind grundsätzlich hydrophil und erzwingen deshalb eine Struktur des Glykoproteins, die diesem Sachverhalt Rechnung trägt. Sie verringern auf jeden Fall das Spektrum möglicher Fehlfaltungen von Proteinen. Zur Absicherung der Arbeitshypothese einer Propeptid- abhängigen Faltung aller Mitglieder der Cathepsin L- ähnlichen Unterfamilie war es also eine interessante Frage in *trans*- Experimenten zu untersuchen, ob und gegebenenfalls in welcher Weise die Rückfaltung von denaturiertem Cathepsin K durch sein Propeptid katalysiert wird. Für diese Untersuchungen soll die vorliegende Arbeit die methodischen Grundlagen schaffen.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Reagenzien

Humanes rekombinantes Cathepsin K stand aus Hefe- Expressionen von D. Brömme; Ass. Prof. Dept. Hum. Genetics; Mount Sinai School of Medicine; Fifth Avenue at 100 st Street; New York 10029 zur Verfügung. Es war in 50 mM Natriumazetat pH 5,5, 1 M NaCl, 0,5 mM DTT gelöst (Linnevers, McGrath et al. 1997).

Als Propeptid wurde bakteriell exprimiertes humanes Cathepsin K- Propeptid aus der eigenen Arbeitsgruppe, gelöst in 0,5 M Guanidinhydrochlorid; 50 mM Natriumazetat pH 4,5; 15 % Azetonitril verwendet (Schlabrakowski 2003).

Substrate: Z-Phe-Arg-AMC (Bachem GmbH)
 Z-Leu-Arg-AMC (Calbiochem)
 Z-Val-Arg-AMC (Bachem GmbH)
 Prionex (Serva)
 Pro-Thr-Glu-Phe-Phe(4-NO₂)-Arg-Leu (Bachem GmbH)

Pepsin aus Schweinemagen (Serva)

Molekulargewichtsmarker für die Elektrophorese

Prestained SDS-Page Standards (Bio Rad)

See Blue® Plus 2 Pre-Stained Standard (Invitrogen)

Materialien für den Cathepsin K Protein- Blot

Primärer Antikörper: Monoklonaler IgM- Antikörper CK64-1C7, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Ekkehard Weber, Physiol. Chem. Institut; Med. Fakultät; M. Luther- Universität Halle; Holly-Str. 1; 06097 Halle

Sekundärer Antikörper gegen Maus- IgM: Peroxidase- gekoppelter Antikörper gegen Maus- IgM (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.)

Western Lightning® Western Blot Chemiluminescence Reagent: ECL- Reagenz (Perkin Elmer Life Sciences)

High Performance Chemiluminescence Film (Amersham Pharmacia Biotech)

Die übrigen Reagenzien stammten von verschiedenen Herstellern und hatten mindestens den Reinheitsgrad p.a.

2.1.2 Enzymaktivitätsmessungen:

Grundrezept für das Testmedium pH Bereich 3,0 bis 8,0: 100 mM Puffersalz / 100 mM NaCl / 1 mM EDTA / 0,01 % Chaps / 5 mM DTT. In Abhängigkeit vom gewünschten pH wurden folgende Puffersalze eingesetzt:

- Natriumzitat (NaZi)
- Natriumazetat (NaAz)
- Natriumphosphat (NaPa)
- TRIS

Falls nicht anders deklariert, wurde als Standardpuffersalz 100 mM NaZi verwendet.

2.1.3. SDS-Elektrophorese

Trenngel 15 %: 5 ml Acrylamid / Bisacrylamid (30 % / 0,8 %) / 2,5 ml 1,5 M TRIS / HCl pH 8,8 / 0,1 ml SDS 10 % / 5 µl TEMED / 0,1 ml APS 10 %, mit Aqua bidest. ad 10 ml auffüllen

Trenngel 10 %: 3,3 ml Acrylamid / Bisacrylamid (30 % / 0,8 %) / 2,5 ml 1,5 M TRIS / HCl pH 8,8 / 0,1 ml SDS 10 % / 5 µl TEMED / 0,1 ml APS 10 %, mit Aqua bidest. ad 10 ml auffüllen

Sammelgel 4,5 %: 1,5 ml Acrylamid / Bisacrylamid (30 % / 0,8 %) / 2,5 ml 0,5 M TRIS / HCl pH 6,8 / 0,1 ml SDS 10 % / 5 µl TEMED / 0,1 ml APS 10 %, mit Aqua bidest. ad 10 ml auffüllen

Probenpuffer: 2,5 ml SDS (20 %) / 1 ml Glycerol / 1,5 ml 1 M TRIS / HCl pH 6,8 / 0,55 ml β-Mercaptoethanol / Bromphenolblau / 20 ml Aqua bidest.

Elektrophoresepuffer: 3 g TRIS / 14,4 g Glycin / 1 g SDS, mit Aqua dest. ad 1 l auffüllen

2.1.4. Western-Blot

Blotpuffer: 25 mM TRIS pH 8,3 / 192 mM Glycin / 20 % Methanol

PBS (151,6 mM): 8 g NaCl (137 mM) / 0,2 g KCl (2,7 mM) / 3,63 g Na₂HPO₄ – 12 H₂O / 0,24 g KH₂PO₄ / pH 7,2 mit Aqua dest. ad 1 l auffüllen

2.1.5. Geräte

Luminescence Spectrometer LS 50 B (Perkin Elmer) mit Quarzglas- Küvetten 2 ml Proben-
volumen, 1 cm Schichtdicke

Mikrotiterplattenfluorometer Spectra Max Gemini (Molecular Devices)

Mikrotiterplatten (Fia- Platte schwarz, 96 Well, F- Form; Greiner Bio- One)

V- Mikrotiterplatten (Hard- Shell™ Thin- Wall, 96 Well, White Wells; MJ Research)

Spektral Photometer DU 70 (Beckman) mit Quarzglas- Küvetten Halbmikro 0,5 ml Proben-
volumen, 1 cm Schichtdicke

Protein- Elektrophoresesystem Mini-Protean II (Bio- Rad)

Gel Dryer 583 (Bio- Rad)

Trans Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio- Rad)

Hubkolbenpipetten 2,5 bis 2500 µl Reference- Serie (Eppendorf)

Vortex Genie 2 (Scientific Industries)

pH- Meter CG 840 (Schott) mit Mikrogaselektrode SenTix (WTW)

MICROCON- Konzentrierungshülsen (Amicon)

2.1.6. Computerprogramme

Word (Microsoft)

Excel (Microsoft)

Prism 4.0 (Graph Pad)

SigmaPlot 8.0

Easy Fit (Lizenz: Prof. Schittkowski, Departement of Mathematics, University of Bayreuth,
95440 Bayreuth, Germany.)

2.2. Methoden

2.2.1. Messung der Cathepsin K- Aktivität

2.2.1.1. Fluorometrische Messung mit AMC- Substraten

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte grundsätzlich durch kinetische Messungen unter Verwendung der Substrate Z-Phe-Arg-AMC, Z-Leu-Arg-AMC oder Z-Val-Arg-AMC. Meist wurde die Fluoreszenz des freigesetzten Produktes Aminomethylcoumarin aufgezeichnet, es wurde bei 360 nm angeregt und bei 440 nm gemessen. Die Eichung der Geräte durch AMC-Zugabe zu den substratfreien Testpuffern mit Mehrfachmessungen unter exakt den gleichen Messbedingungen ermöglichte es bei Bedarf die gerätespezifischen Fluoreszenzeinheiten in die molaren Produktkonzentrationen umzurechnen. Die Aktivitätsmessungen fanden entweder in Mikrotiterplatten bei Raumtemperatur oder in gerührten Küvetten bei 20 °C oder 37 °C statt. Die Empfindlichkeit der Messungen wurden durch Veränderung der Spaltbreiten so eingestellt, dass einerseits die Fluoreszenz der Substratlösung („Hintergrund“) unter 2/3 des maximalen Messbereiches blieb und andererseits bei $[E] \ll [S]$ bzw. $[I]$ innerhalb von 1 bis 5 Minuten die gebildete Produktkonzentration die Obergrenze des Messbereiches erreichte.

Das Standardtestgemisch hatte folgende Zusammensetzung: 100 mM NaCl / 100 mM NaZi pH 5,0 / 1 mM EDTA/ 5 mM DTT / 0,01 % Chaps / 1 % DMSO und Substrat in unterschiedlichen Konzentrationen. Das Testgemisch wurde im Wasserbad vortemperiert und danach in die im temperierten Küvettenhalter des Gerätes befindliche Küvette gegeben. Der Start der Registrierung erfolgte zeitgleich mit der Zugabe des Enzyms.

2.2.1.2. Photometrische Messung mit AMC- Substraten

Die Peptidsubstrate Z-Phe-Arg-AMC, Z-Leu-Arg-AMC und Z-Val-Arg-AMC besitzen ein anderes Absorbanzmaximum als das Produkt Aminomethylcoumarin. Somit ist die Absorbanzmessung im langwelligen UV- Bereich ein alternatives Verfahren zur Enzymaktivitätsbestimmung, wegen der geringeren Empfindlichkeit vorteilhaft bei hohen Produktkonzentrationen. Die AMC- Bildung führt zu einem Absorbanzanstieg. Die Messungen fanden in Halbmikroküvetten mit dem Photometer DU70 statt. Als Testpuffer diente auch hier der schon beschriebene Standardtestpuffer. Da das Gerät DU70 keine Möglichkeit zum kontinuierlichen Rühren der Küvetten besitzt, wurde der Inhalt der vortemperierten Küvette jeweils nach der Enzymzugabe außerhalb des Gerätes kurz mit dem Vibrationsschüttler gemischt. Der dadurch bedingte Zeitversatz zwischen Reaktionsstart und Beginn der Registrierung wurde bei der Auswertung der sogenannten Progresskurven berücksichtigt. Die Enzymkonzentration war so hoch gewählt, dass in weniger als 10 min das Substrat nahezu vollständig aufgebraucht wurde und somit die Geschwindigkeit der Produktzunahme am Ende der Messungen gegen Null ging.

2.2.2. Bestimmung der kinetischen Konstanten für die Reaktion von Cathepsin K mit Substraten und seinem Propeptid

2.2.2.1 Cathepsin K und seine Substrate

Alle Experimente zur Bestimmung der Enzym- kinetischen Daten fanden in Glasküvetten statt. Nur so war eine genaue Temperierung möglich. Die Substrate wurden in DMSO gelöst und als 2 bis 30 mM Stammlösungen verwendet. Die Messung der Enzymaktivität erfolgte mit dem oben beschriebenen fluorometrischen Standardtest. In einer Messzeit von 60 Sekunden wurden 120 Werte registriert, aus denen mittels linearer Regression nach Gleichung 1 die Anfangsgeschwindigkeit berechnet wurde.

$$P = v_z * t + P_0$$

Gleichung 1

(P = Produktkonzentration, P₀ = Produktkonzentration zum Startzeitpunkt; t = Zeit, v_z = Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion bei der gegebenen Substratkonzentration)

Waren die Produktbildungszeitkurven nicht linear, erfolgte die Berechnung der Anfangsgeschwindigkeit mit Gleichung 2.

$$P = (v_z * t)^{(-b \cdot t)} + P_0 \quad \text{Gleichung 2}$$

(b = Geschwindigkeitsverlust der Reaktion pro Zeiteinheit)

In einigen Experimenten erfolgte die Berechnung der Inaktivierungsgeschwindigkeit aus der Krümmung der Produktbildungszeitkurven. Bei geringer Krümmung der Kurven war das mit guter Annäherung mit Gleichung 2 möglich, sonst wurde dazu Gleichung 3 genutzt.

$$P = v_s * t + (v_z - v_s) * (1 - \exp(-b * t)) / b + P_0 \quad \text{Gleichung 3}$$

(v_s = Steady- State- Geschwindigkeit der Reaktion)

Die errechneten Anfangsgeschwindigkeiten wurden als Funktion der Substratkonzentration graphisch dargestellt. In diesen Diagrammen zeigten alle fluorogenen Substrate nicht die erwartete Michaelis- Menten- Kinetik (Gleichung 4).

$$v = \frac{V_{\max} * S_0}{K_M + S_0} \quad \text{Gleichung 4}$$

(v = Geschwindigkeit der Produktbildung, V_{\max} = Maximalgeschwindigkeit, S_0 = anfängliche Substratkonzentration, K_M = Michaelis- Menten- Konstante für das Substrat)

Man beobachtete eine von der Michaelis- Menten- Hyperbel abweichende $v = f([S])$ Kinetik, die als Substrathemmung interpretiert wurde und die durch Gleichung 5 beschrieben wird. Hier entsteht durch die gleichzeitige Bindung zweier Substratmoleküle (S) an das Enzym (E) ein Enzym- Substrat- Substrat- Komplex (ESS), der nicht in die Reaktionsprodukte gespalten werden kann.

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_M}{S_0} + \frac{S_0}{K_i}} \quad \text{Gleichung 5}$$

(K_i : Dissoziationskonstante des ESS- Komplexes)

Abbildung 1 zeigt dazu ein fiktives Beispiel. Aus Gleichung 5 ist zu erkennen, dass der Verlauf der Kurven vom Verhältnis zwischen K_M und K_i abhängt. Ist $K_M \ll K_i$, so erhält man für nicht zu hohe Substratkonzentrationen im Vergleich zu K_M / S_0 einen vernachlässigbar kleinen Wert für S_0 / K_i und kann deshalb den K_M -Wert mit hinreichender Genauigkeit die Auswertung nach Michaelis-Menten vornehmen. Ist jedoch K_M etwa gleich groß wie K_i , ergibt sich die in Abbildung 1 wiedergegebene Kinetik.

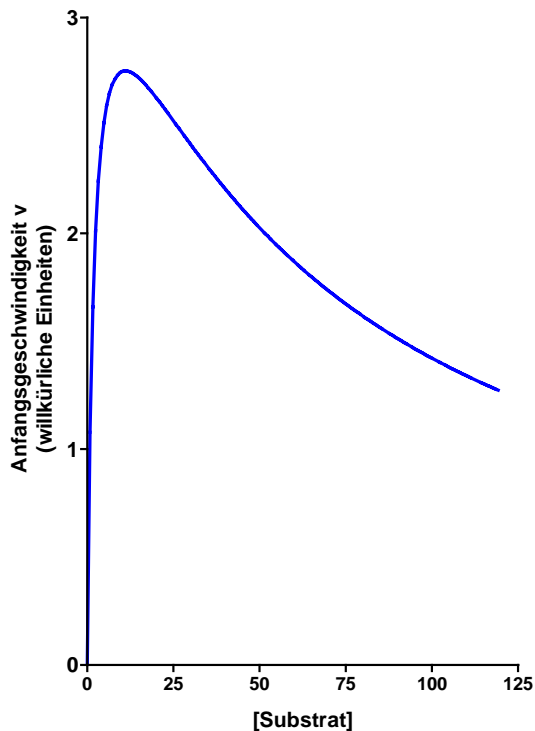


Abbildung 1: Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit der Produktbildung (v_z) von der Substratkonzentration bei Substrathemmung. Durch die gleichzeitige Anlagerung von zwei Substratmolekülen in unproduktiver Orientierung kommt es bei höheren Substratkonzentrationen zu einem Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit (Schellenberger and Fischer 1989).

In diesem Fall kann die Geschwindigkeit der Reaktion nur einen optimalen Wert erreichen, der deutlich unter der theoretischen Maximalgeschwindigkeit liegt. Durch Differenzieren der Gleichung 5 kann man die Koordinaten dieses Optimums bestimmen. Die optimale Substratkonzentration errechnet sich nach Gleichung 6:

$$[S_{opt}] = \sqrt{K_i \cdot K_m} \quad \text{Gleichung 6}$$

und die zugehörige optimale Geschwindigkeit mit Gleichung 7:

$$v_{opt} = \frac{V_{max}}{1 + 2\sqrt{\frac{K_m}{K_i}}} \quad \text{Gleichung 7}$$

Die Berechnung von K_M , K_i und V_{max} erfolgte durch nichtlineare Optimierung unter Verwendung von Gleichung 5. Zur vergleichenden Auswertung eines Experimentes mit zwei verschiedenen Modellen wurde Gleichung 4 verwendet. Diese vergleichende Auswertung zwischen den Modellen „Michaelis- Menten mit Substrathemmung“ und „einfache Michaelis- Menten-Kinetik“ mit dem Programm PRISM lieferte die prozentuale Wahrscheinlichkeit für die Richtigkeit des jeweiligen Modells.

Alternativ wurden die gleichen Parameter aus dem Zeitverlauf der photometrisch gemessenen Produktbildung bei Totalhydrolyse der AMC- Substrate, den sogenannten Progresskurven, ermittelt. Zur Berechnung der Produktkonzentration aus der gemessenen Absorbanz (A) wurde das Lambert- Beersche Gesetz genutzt (Gleichung 8). Die Messungen erfolgten bei 360 nm und einer optischen Schichtdicke (d) von 1 cm. Der Extinktionskoeffizient bei dieser Wellenlänge (ϵ) beträgt 13436 cm²/mmol.

$$P = \frac{A}{\epsilon * d} \quad \text{Gleichung 8}$$

Die Schätzung der Parameter K_M , K_i und k_{cat} erfolgte nach numerischer Integration des folgenden Differenzialgleichungssystems mit dem Programm Easy Fit.

$$P' = k_{cat} * E_{aktiv} * \frac{P_{\omega} + P_0 - P}{K_M + (P_{\omega} + P_0 - P) * (1 + (P_{\omega} + P_0 - P) / K_i)} \quad \text{Gleichung 9}$$

$$E_{aktiv}' = k_{Inaktivierung} * E_{aktiv} * \frac{K_M}{K_M + (P_{\omega} + P_0 - P) * (1 + (P_{\omega} + P_0 - P) / K_i)} \quad \text{Gleichung 10}$$

Gleichung 9 beschreibt die Produktbildung und Gleichung 10 den unvermeidlichen Aktivitätsverlust des Enzyms während der Messzeit, wobei P_0 die Produktkonzentration zum Zeitpunkt 0, P die Produktkonzentration zum Zeitpunkt der Messung und P_{ω} die Produktkonzentration im unendlichen nach vollständigem Substratumsatz darstellt. $k_{Inaktivierung}$ beschreibt die Geschwindigkeit des unvermeidlichen Aktivitätsverlusts des Enzyms (E).

2.2.2.2. Cathepsin K und sein Propeptid

In Kontrollmessungen von Cathepsin K im fluorometrischen Standardtest ohne Propeptid-Zusatz wurden die optischen Messbedingungen festgelegt. Cathepsin K- Propeptid wurde aus mikromolaren Stammlösungen in nanomolaren Konzentrationen dem Test zugesetzt (max. 1 Vol %) und die Reaktion wurde durch Zusatz des Enzyms gestartet. Zeitgleich begann die

Registrierung der Produktbildungs- Zeit- Kurve. Jede dieser Kurven lässt sich durch drei Differenzialgleichungen beschreiben: die Geschwindigkeit ($k_{\text{Inaktivierung}}$) des unvermeidlichen Aktivitätsverlusts des Enzyms (E) während der Messzeit durch Gleichung 11, Bildung (k_{on}) und Zerfall (k_{off}) des Komplexes aus Enzym und Inhibitor (EI) durch Gleichung 12 und die Produktbildung (P) als Funktion der Wechselzahl (k_{cat}) und der Konzentration des Enzym-Substrat- Komplexes (ES) durch Gleichung 13 (modifiziert nach Moss und Mitarbeiter (Moss, Kuzmic et al. 1996)). Die Stärke der Bindung des Propeptids an sein Mutterenzym wurde aus 11 bis 13 solchen Kurven, die bei unterschiedlichen Propeptidkonzentrationen gemessen wurden, durch Schätzung der Parameter k_{on} und k_{off} mit dem Programm Easy- Fit bestimmt.

$$E_{\text{inaktiv}}' = k_{\text{Inaktivierung}} * E \quad \text{Gleichung 11}$$

$$EI' = k_{\text{on}} * E * I - k_{\text{off}} * EI \quad \text{Gleichung 12}$$

$$P' = k_{\text{cat}} * ES \quad \text{Gleichung 13}$$

Diese aufwendige Auswertung war deshalb notwendig, weil die klassischen Auswerteverfahren bei langsamer fester Bindung zwischen Enzym und Propeptid eine konstante Geschwindigkeit der Kontrollmessungen voraussetzten, die hier nicht immer erreicht werden konnte.

2.2.3 Cathepsin K- Konzentrationsbestimmung durch E64- Titration

Zur Berechnung der katalytischen Konstante (k_{cat}) musste die wirksame Enzymkonzentration in der jeweiligen Arbeitsverdünnung von Cathepsin K bestimmt werden. Wir waren anfangs unsicher, ob es durch Pipettierfehler und ähnliche Unsicherheiten zu Konzentrationsschwankungen kommt und haben diese Titration deshalb mehrmals durchgeführt, mit der jeweils am gleichen Tag verwendeten Cathepsin K- Verdünnung. Diese Ergebnisse stimmten im Rahmen der Fehlerbreite des Verfahrens ($\pm 3,3 \%$ bei 3 Einzelversuchen) überein und wurden deshalb am Ende gemittelt.

E64 ist ein hochaffiner Inhibitor von Cysteinproteasen und damit auch von Cathepsin K. Er reagiert mit der SH- Gruppe im katalytischen Zentrum und bindet sehr fest, aber nicht irreversibel. Da die Bindung von Enzym und E64 im Verhältnis 1:1 stattfindet, kann nach Gleichgewichtseinstellung aus der reziproken Abhängigkeit zwischen der ansteigenden E64- Konzentration und der Restaktivität des Enzyms dessen Konzentration errechnet werden. Die Gleichgewichtseinstellung dauert bei Raumtemperatur und nanomolaren Konzentrationen der Reaktanten 30 bis 60 min. Weitere Details des experimentellen Ablaufs sind in der Legende

zu Abbildung 2 beschrieben. In der Literatur wird meist noch der vereinfachende Idealfall einer irreversiblen Reaktion und einfach abrupter Übergang von der teilweisen zur vollständigen Hemmung angenommen, der in Abbildung 2 zu einem Knick der Kurve führen müsste.

Man erkennt aber deutlich, dass ein nichtlinearer Übergang vorliegt. Die Krümmung ist dabei um so ausgeprägter, je stärker sich die Konzentration der Reaktanten dem K_i -Wert der Reaktion annähert, wie das bereits von Baici am Beispiel der Elastasehemmung durch Antikörper gezeigt wurde (Baici 1986). Den K_i -Wert der Reaktion zwischen E64 und Cathepsin K bestimmte ich zu 0,3 nM.

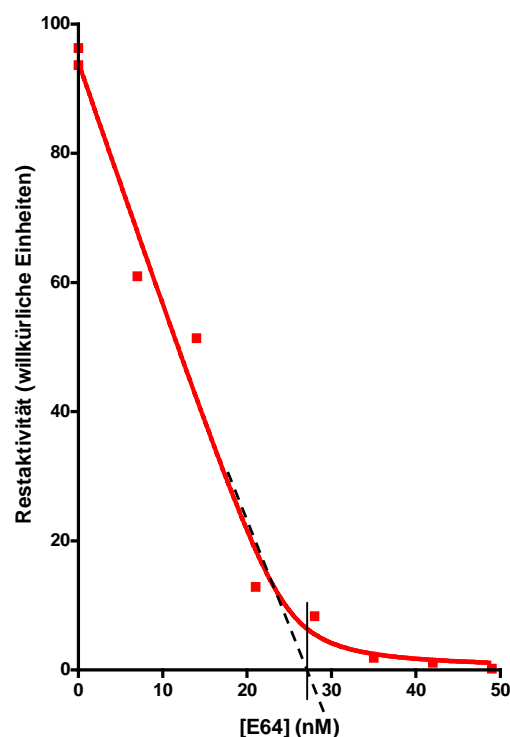


Abbildung 2: Cathepsin K- Konzentrationsbestimmung durch E64- Titration

Cathepsin K wurde mit Standardpuffer pH 6,0 verdünnt, im gleichen Puffer wurden auch acht E64- Verdünnungen zwischen 0 und 49 nM hergestellt. In einer V- MTP wurden je 5 µl beider Reaktanten vermischt, abgedeckt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgte mit einer Reih Pipette die Zugabe von 190 µl Standardtestpuffer und die kinetische Messung der Produktbildung bei Raumtemperatur mit dem Reader Spectra Max Gemini. Die Bestimmung der Restaktivität des Enzyms erfolgt durch lineare Regression. Die totale Enzymkonzentration (Y_t) wurde anschließend durch nichtlineare Regressionsanalyse der Restaktivität als Funktion der E64- Konzentration unter Verwendung von Gleichung 17 ermittelt.

Daraus ergeben sich folgende Ansätze zur Berechnung der totalen Cathepsin K- Konzentration:

$$[XY] = 1 / K_i * [Y] * [X]$$

Gleichung 14

$$[Y_t] = [Y] + [XY]$$

Gleichung 15

$$[X_t] = [X] + [XY]$$

Gleichung 16

($[XY]$ = Konzentration des Enzym- Inhibitor- Komplexes, $[Y]$ = Konzentration des freien, aktiven Enzyms; $[X]$ = Konzentration an freiem Inhibitor; $[Y_t]$ = totale Enzymkonzentration; $[X_t]$ = totale Inhibitorkonzentration)

Gleichung 14 definiert die Hemmkonstante K_i für die Reaktion zwischen E64 und Cathepsin K, Gleichung 15 und 17 sind die Erhaltungsgleichungen zur Berechnung der totalen Enzym- bzw. Inhibitorkonzentrationen. Setzt man die beiden Erhaltungsgleichungen in Gleichung 14 ein, ergibt sich eine quadratische Gleichung, deren Lösung Gleichung 17 beschreibt:

$$Y = Y_0 / Y_t * (SQRT((K_i + X - Y_t) * (K_i + X - Y_t) / 4 + Y_t * K_i) - (K_i + X - Y_t) / 2) + C \quad \text{Gleichung 17}$$

(Y: freie Ligandkonzentration; X: E64 Konzentration; Y_t : Totale Ligandkonzentration;
 Y_0 / Y_t : Proportionalitätsfaktor, der die Angabe der Enzymaktivität in willkürlichen Einheiten zulässt)

2.2.4. SDS- Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese wurde nach Lämmli mit 4,5 %igen Sammel- und 10 %igen oder 15 %igen Trenngelen durchgeführt. Die Denaturierung der Proben erfolgte durch Mischung mit mehrfach konzentriertem Probenpuffer, so dass sich final die vorgeschriebenen Konzentrationen der einzelnen Bestandteile des Probenpuffers ergaben. Diese Mischung wurde 10 Minuten bei 100 °C erhitzt und abschließend zentrifugiert. Zur Molekulargewichtsmarkierung dienten kommerziell erhältliche Markerproteine. Die Elektrophoresedauer betrug ca. 45 Minuten bei 200 V.

2.2.5. Färbung von Polyacrylamidgelen

Silberfärbung

Zum empfindlichen Nachweis der aufgetrennten Proteine wurden Silberfärbungen der Elektrophoresegele nach der folgenden Vorschrift durchgeführt:

1. Fixierung in Isopropanol (25 %) + Eisessig (10 %) 30 min
2. Vernetzen mit Glutaraldehyd (5 %, gelöst in H_2O) 30 min
3. Waschen mit Ethanol (20 %) 3* 10 min
4. Behandlung mit DTT (32 μ l der Stammlösung auf 100 ml H_2O) 30 min
 (Stammlösung: 1,5 mg DTT auf 100 μ l H_2O)
5. Silbernitratlösung (0,1 g auf 100 ml H_2O) 30 min
6. kurz waschen mit Wasser, gut absaugen, evt. mit Entwickler spülen
7. Entwickeln mit 3 % Natriumkarbonat mit 0,062 % Formalin
8. Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 2,3 M Zitronensäure
9. Waschen mit Ethanol (50 %)

Coomassie- Färbung

Färbelösung: 0,15 g Coomassie- Blau; 40 ml Ethanol; 40 ml H₂O; 8 ml Essigsäure

Entfärber: 50 ml Essigsäure; 150 ml Methanol; 300 ml H₂O

Die SDS- Gele wurden 30 bis 60 Minuten in Färbelösung geschwenkt und danach schrittweise im Entfärber entwickelt. Anschließend erfolgte die Spülung in H₂O und die Trocknung zwischen Zellophan unter Vakuum bei 60°C (Gel Dryer, Bio- Rad).

2.2.6. Western- Blot

Die Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte elektrophoretisch bei 20 V / 500 mA über 40 Minuten. Anschließend wurden die freien Bindungsstellen der Membran mit Casein abgesättigt. Zum spezifischen Nachweis wurde die Blotmembran mit dem 1:50 in PBS verdünnten IgM- Antikörper CK64-1C7 gegen Cathepsin K inkubiert. Nach der Inkubation der Blot- Membran mit dem 1:5 000 verdünnten Anti- IgM- Antikörper erfolgte die Waschung mit PBS / Triton 10 %. Schließlich wurde der POD- gekoppelte sekundäre Antikörper mit der ECL- Methode detektiert:

ECL-Methode (enhanced chemiluminescence): Die mit Filterpapier abgetrocknete Membran wurde für eine Minute in die ECL- Lösung gelegt, welche vorher zu gleichen Teilen aus Lösung 1 und 2 des kommerziellen Reagenziensatzes hergestellt wurde. Danach wurde die Membran leicht abgetrocknet, in Seranfolie eingewickelt und zusammen mit dem Film in eine Kassette gelegt. Die Peroxidase oxidiert Luminol im alkalischen Milieu mit Hilfe von H₂O₂ zu einem Radikal, das einige Minuten lang Licht emittiert. Nach einer Expositionszeit von ca. 1 Minute ergab sich dort eine Schwärzung des Films, wo Proteine unter Vermittlung des primären Antikörpers auf der Blotmembran den Peroxidase- gekoppelten sekundären Antikörper gebunden haben.

2.2.7. Azocasein- Verdauung

Azocasein wird aus natürlichem Casein durch Bindung diazotierter Sulfanilsäure an Histidin- und Tyrosinreste des Proteins hergestellt. Durch Inkubation des Azocasein mit einer Protease werden Peptidbindungen gespalten, aus dem Protein entstehen Peptide und Aminosäuren. Durch Zugabe von Trichloressigsäure wird die Reaktion gestoppt und es kommt zur Denaturierung der Proteine (Protease und unverdautes Azocasein), während die entstandenen Peptide und Aminosäuren in Lösung bleiben. Durch Zentrifugation werden die Protein- Präzipitate aus dem Reaktionsgemisch entfernt, die Farbintensität der Peptide im Überstand

wird spektrophotometrisch gemessen und lässt Rückschlüsse auf die Aktivität des eingesetzten Enzyms zu (Wiederanders, Kirschke et al. 1986).

Beim Nachweis der Azocasein- Verdauung durch Cathepsin K wurde folgendermaßen vorgegangen: 1000 µl Aktivierungspuffer (100 mM NaZi pH 5,5 / 100 mM NaCl / 10 mM EDTA / 10 mM DTT) wurden mit 500 µl 2 % Azocasein (in H₂O gelöst) im Eisbad vermischt. Nach Zugabe von 500 µl Cathepsin K (verdünnt in Aktivierungspuffer) wurde bei 37 °C 1 Stunde lang inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 ml 10 % Trichloressigsäure im Eisbad gestoppt. Nach Zentrifugation mit 10 000g wurde die Absorbanz des Überstands bei 360 nm gemessen.

2.2.8. Aminogruppenbestimmung nach YEMM und COCKING

α- Aminosäuren reagieren mit Ninhydrin unter Bildung eines violett- braunen Farbstoffes. Im ersten Teilschritt reagiert die primäre Aminogruppe mit einem Ninhydrinmolekül, es bildet sich ein Aminoketon. Die Aminosäure wird dabei oxidativ zum Aldehyd decarboxyliert. Im zweiten Schritt reagiert unter Wasserabspaltung das Aminoketon mit einem zweiten Molekül Ninhydrin, es entsteht der rotbraune Farbstoff, der sogenannte Ruhemannsche Purpur. Dieser letzte Schritt der Reaktion ist stark temperaturabhängig, durch Erhöhung der Temperatur kann die Reaktion stark beschleunigt werden.

Reagenzien: 0,2 M Azetatpuffer pH 5,0

Ninhydrinreagenz (2,08 g Ninhydrin + 5 ml 0,01 N KCN- Lösung +
Methylcellosolve ad. 250 ml)

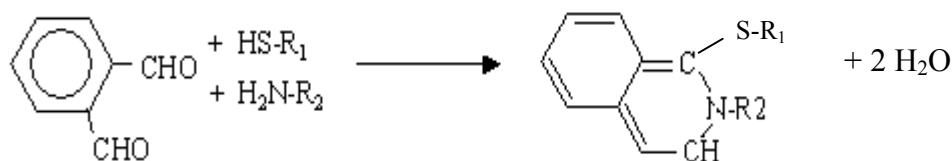
Ansatz: 2 ml 0,2 M Azetatpuffer

10 µl Probe (durch Cathepsin K- verdautes Prionex[®])

0,5 ml Ninhydrinreagenz

Der Ansatz wurde in verschlossenen Reagenzgläsern 15 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt, 5 Minuten in Eiswasser gekühlt und anschließend bei 578 nm photometriert.

2.2.9. Aminogruppenbestimmung mit der Orthophthal-dialdehyd- (OPA) methode



Schema 1: Orthophthaldialdehyd- Reaktion: OPA reagiert in Gegenwart von SH- Gruppen (z.B. DTT) mit primären Aminen, das Reaktionsprodukt absorbiert Licht bei 339 nm und emittiert Fluoreszenzlicht bei 438 nm (Nielsen P. M., Petersen et al. 2001).

Orthophthaldialdehyd reagiert mit primären Aminosäuren in Gegenwart von SH- Gruppen unter Ausbildung eines fluoreszierenden Reaktionsproduktes, das nicht sehr stabil ist. Die OPA- Methode wurde nach Nielsen und Mitarbeitern durchgeführt. Die Herstellung des Reagenz erfolgte nach folgender Vorschrift (Nielsen P. M., Petersen et al. 2001):

- 1.) 762 mg Dinatriumtetraborat wurden in 15 ml deionisierten Wasser gelöst
- 2.) 16 mg Orthophthaldialdehyd (97 %) wurden in 0,4 ml Ethanol gelöst
- 3.) Nachdem sich beide Substanzen komplett gelöst hatten, wurde das in Ethanol gelöste OPA in Lösung 1 gegeben, das Gefäß wurde mit deionisierten Wasser nachgespült.
- 4.) Zum Schluss wurde dieser Ansatz mit 17,6 mg DTT versetzt und mit deionisiertem Wasser auf 20 ml aufgefüllt.

In V- Mikrotiterplatten wurde 180 µl der zu bestimmenden Probe mit 20 µl OPA- Reagenz vermischt und sofort kinetisch am Fluorometer bei 339 / 438 nm vermessen. Die kinetische Messung erlaubte die Bestimmung des Fluoreszenzmaximums, das nach vollständigem Ablauf der Reaktion aber vor dem Intensitätsabfall infolge der schon genannten Instabilität des Fluorogens auftrat. Kalibriert wurde mit Glycin- Eichwerten im Konzentrationsbereich von 0 bis 50 µM.

2.2.10. Diafiltration des Cathepsin K- Propeptids mit MICROCON®- Hülsein

Es wurde die Durchlässigkeit von vier Membrantypen mit nominellen Durchlässigkeiten für Proteine mit Molekulargewichten von 10 bis 100 kDa getestet. Dazu wurde eine Lösung, die 1 µM Propeptid enthielt, in die Hülse gegeben und so lange zentrifugiert, bis Filtrat und Retentat etwa gleich groß waren. Nach Herstellerangaben müsste dabei das kleine Propeptid zusammen mit der Flüssigkeit durch die Poren der Membran in das Filtrat gelangen, das Filtrat müsste also theoretisch die gleiche Hemmwirkung auf die Aktivität von Cathepsin K wie die Ausgangslösung zeigen. Deshalb wurden Aliquots des Filtrats und des Retentats in

fluorometrische 2 ml Standardtests mit einer konstanten gut messbaren Menge an Cathepsin K eingesetzt und die Hemmwirkung verglichen.

2.2.11. Abbau des Cathepsin K- Propeptids durch Cathepsin K

96 nM Cathepsin K wurden mit 1 μ M Propeptid bei pH 6,0 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der entstandene Cathepsin K- Propeptid- Komplex wurde 1: 4 in pH 4,0- Prozessierungspuffer (100 mM NaZi / 100 mM NaCl / 1 mM EDTA / 0,01 % Chaps / 1 mM DTT) verdünnt und bei Temperaturen von 13 °C bis 28 °C über einen Zeitraum von 1 bis 29 Stunden inkubiert. In definierten Zeitabständen wurden Aliquots entnommen, in denen die Cathepsin K- Aktivität nach 1:200 Verdünnung im 2 ml Makrotest (Testpuffer: 100 mM NaPa pH 6,0 / 100 mM NaCl / 1 mM EDTA / 0,01 % Chaps / 1 mM DTT / 25 μ M Z-Phe-Arg-AMC) bei 37 °C bestimmt wurde.

2.2.12. Abbau des Cathepsin K- Propeptids mit Pepsin

246,6 nM Cathepsin K wurden mit 10 oder 20 μ M Propeptid bei pH 6,0 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der entstandene Cathepsin K- Propeptid- Komplex wurde 1: 20 in Pepsin- haltigen Prozessierungspuffer (100 mM NaZi pH 4,0 / 100 mM NaCl / 1 mM EDTA / 0,01 % Chaps / 5 mM DTT / 1 μ M bis 100 μ M Pepsin) verdünnt und bei Temperaturen von 4 °C bis 28 °C über einen Zeitraum von 30 Minuten bis 4 Stunden inkubiert.

In definierten Zeitabständen wurden Aliquots entnommen, in denen die Cathepsin K Aktivität nach 1:20 Verdünnung in Mikrotiterplatten mittels Standardtest bei pH 5,0 mit 20 μ M Z-Leu-Arg-AMC bestimmt wurde. Die kinetische Messung erfolgte mit dem Reader Spectra Max Gemini bei Raumtemperatur.

Pepsinaktivitätsbestimmung

Die Konzentration an enzymatisch aktivem Pepsin ($[E]$) wurde aus der photometrisch bestimmten Maximalgeschwindigkeit (V_{\max}) des Umsatzes des chromogenen Substrates Pro-Thr-Phe-Phe(4-NO₂)-Arg-Leu bei 37 °C unter Verwendung der in der Literatur für diese Versuchsbedingungen angegebenen katalytischen Konstante (k_{cat}) von 89 s⁻¹ nach der Gleichung $[E] = V_{\max} / k_{\text{cat}}$ berechnet (Dunn, Jimenez et al. 1986). Die Versuchsbedingungen wurden deshalb exakt nach Dunn und Mitarbeitern gewählt: 0,1 M Na- Formiatpuffer pH 3,1, 37°C. Die Registrierung des Substratverbrauchs erfolgte durch Messung der abfallenden Absorbanz bei 310 nm. Zur Umrechnung der gemessenen Absorbanz in Konzentrationen wurde der Absorbanzkoeffizient (ϵ_{310}) aus ΔA_{310} nach totaler Substrathydrolyse bei Ausgangskonzentrationen zwischen 25 und 100 μ M berechnet. Er beträgt bei einem Lichtweg

von $1 \text{ cm } 1072 \pm 46 \text{ M}^{-1}$. Es wurden insgesamt sechs Messungen bei unterschiedlicher Substrat- und Enzymkonzentration durchgeführt. Abbildung 3A zeigt die Bestimmung von V_{\max} aus den Anfangsgeschwindigkeiten der Produktbildung unter Verwendung von Gleichung 4. Das war so einfach möglich, weil der $K_M = 80 \text{ }\mu\text{M}$ unter den gewählten Versuchsbedingungen bekannt war (Dunn, Jimenez et al. 1986). Um die Zuverlässigkeit der Methode zu prüfen, wurde die aus der Einwaage und dem vom Hersteller angegebenen Molekulargewicht (36 kD) berechnete Enzymkonzentration variiert und mit der gemessenen Enzymaktivität korreliert (Abbildung 3 B). Berechnete (15,2 nM) und gemessene (14,1 nM) Pepsinkonzentration stimmte im Rahmen der Fehlerbreite der Bestimmung überein.

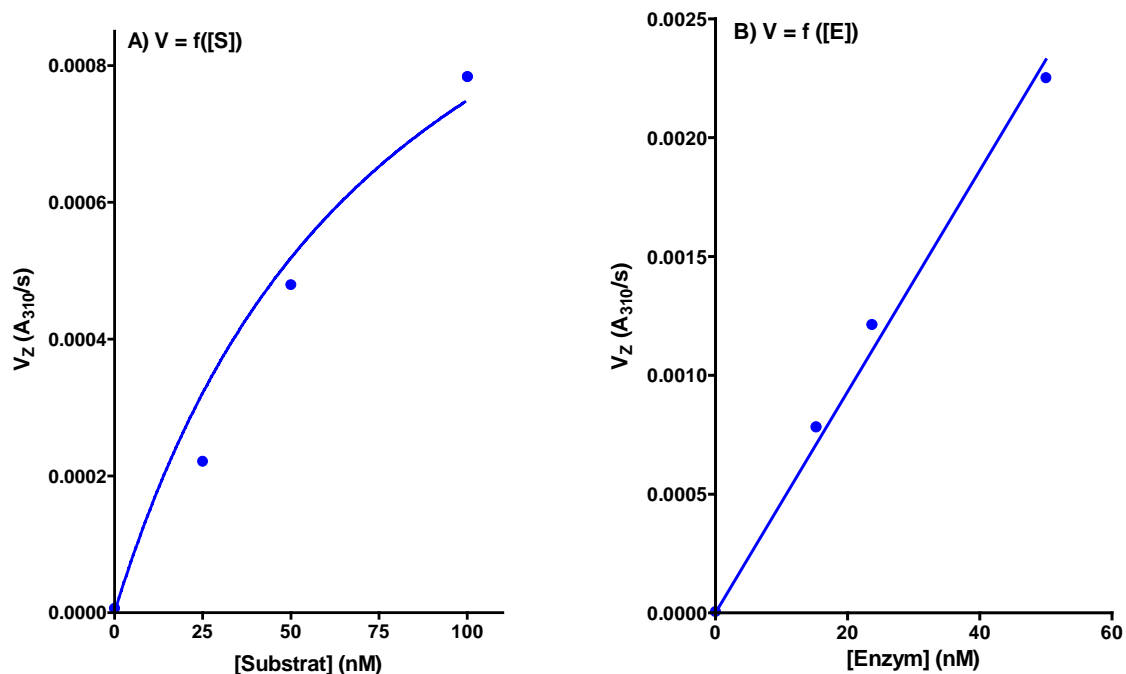


Abbildung 3: Pepsinaktivitätsbestimmung: Die Kinetik der Hydrolyse des chromogenen Substrats Pro-Thr-Phe-Phe(4-NO₂)-Arg-Leu wurde durch Absorbanzmessung in Natrium-Formiatpuffer 0,1 M bei pH 3,1 und 37 °C mit dem Photometer DU 70 bei 310 nm verfolgt. Aus den abfallenden Absorbanzkurven erfolgte die Berechnung des initialen Absorbanzabfalls pro Sekunde, die in Abhängigkeit von der Substrat- (Abbildungsteil A, 15,2 nM Pepsin) bzw. Enzymkonzentration (Abbildungsteil B, 100 μM Substrat) dargestellt sind.

3. Zielstellung

Die Zielstellung dieser Arbeit war die systematische Untersuchung und Darstellung der Vor- und Nachteile von Verfahren zur vollständigen oder zumindest weitgehenden Elimination der inhibitorischen Wirkung von Cathepsin K- Propeptid auf die Aktivitätsmessung des Mutterenzyms, die entscheidende Voraussetzung zur Bearbeitung der in der Einleitung beschriebenen Fragestellung nach dem Faltungsweg dieser Protease in Abhängigkeit vom Propeptid. Dazu boten sich die nachstehend aufgelisteten Verfahren an.

Methoden ohne separaten Trennschritt

Diese sind sehr einfach durchzuführen und basieren auf der Konkurrenz zwischen Propeptid und Substrat um die Bindung im aktiven Zentrum des Enzyms. Alle bisher charakterisierten Reaktionen zwischen Propeptiden und Enzymen der Papainfamilie sind kompetitiv (Fox, de Miguel et al. 1992; Carmona, Dufour et al. 1996; Volkel, Kurz et al. 1996; Maubach, Schilling et al. 1997; Visal, Taylor et al. 1998), auch für das Cathepsin K ist das bereits bekannt (Billington, Mason et al. 2000; Guay, Falgueyret et al. 2000). Folglich kann auch in Gegenwart des inhibitorischen Propeptides ein Substratumsatz erwartet werden. Die Produktbildungsrate wird um so größer sein, je höher die Substratkonzentration und je größer dessen Affinität zum Enzym, d.h. je kleiner der K_M - Wert ist. Nachfolgend sind mögliche Substrate und die jeweiligen Verfahren zum Nachweis der Produktbildung aufgelistet.

1. Verwendung chromogener Peptidsubstrate, Fluorometrie oder Photometrie der chromogenen Gruppe
2. Verwendung chromogener Proteinsubstrate, Photometrie der gefärbten Peptidprodukte
3. Verwendung einfacher Proteinsubstrate, Nachweis der Spaltung mit:
 - a) Aminogruppenbestimmung
 - b) HPLC oder Massenspektrometrie
 - c) SDS- Elektrophorese mit anschließender Silberfärbung
 - d) Proteinbestimmung mit Coomassie Blau G-250 nach Abtrennung der Peptidprodukte

Methoden mit separatem Trennschritt

Eine Trennung des ungebundenen Propeptids vom freien Enzym und vom Enzym- Propeptid-Komplex sollte wegen der erheblichen physiko- chemischen Unterschiede zwischen beiden (Molekulargewicht, Ladung, Proteaseresistenz) relativ einfach möglich sein. Da die Propeptidfraktion nach einer Trennung ohnehin verworfen würde, wäre auch die gezielte

Zerstörung des Propeptids ein möglicher Trennschritt. Ein solcher Zwischenschritt erhöht zwar den analytischen Aufwand, verbessert aber mit großer Wahrscheinlichkeit die Nachweisgrenze der sich anschließenden Enzymaktivitätsmessung. An die folgenden fünf Methoden wurde gedacht:

1. Verfahren zur spezifischen Zerstörung des Propeptids
 - 1.1. Abbau des Propeptids durch Cathepsin K
 - 1.2. Spezifischer proteolytischer Abbau des Propeptids
2. Verfahren zur Abtrennung des Propeptids vom reifen Enzym
 - 2.1. Diafiltration
 - 2.2. Gelchromatographie
 - 2.3. Zymographie

Diese Gliederung ist nach theoretischen Überlegungen systematisch geordnet. Bei der praktischen Umsetzung wurden Auswahl und Reihenfolge der Durchführung auf der Grundlage der methodischen Erfahrungen und technischen Möglichkeiten im Labor und den nach Literaturdaten abgeschätzten Erfolgsaussichten vorgenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung der Cathepsin K- Charge

Für die Versuche stand uns rekombinantes humanes Cathepsin K zur Verfügung. Dieses Enzym wird in Hefe als Proenzym exprimiert, mit Pepsin zum reifen Enzym prozessiert und abschließend gereinigt (Linnevers, McGrath et al. 1997).

Da es für die Ziele der Arbeit von großer Bedeutung ist, dass das Enzym absolut frei von Procathepsin K ist, sollte eine SDS- Gelelektrophorese durchgeführt werden. Ziel war es, reifes Cathepsin K mit einem Molekulargewicht von ca. 29000 Dalton von dem eventuell noch in der Charge vorhandenen schwereren unreifen Enzym (ca. 39000 Dalton) zu trennen und die Banden anschließend mit Coomassie- und Silberfärbung sichtbar zu machen.

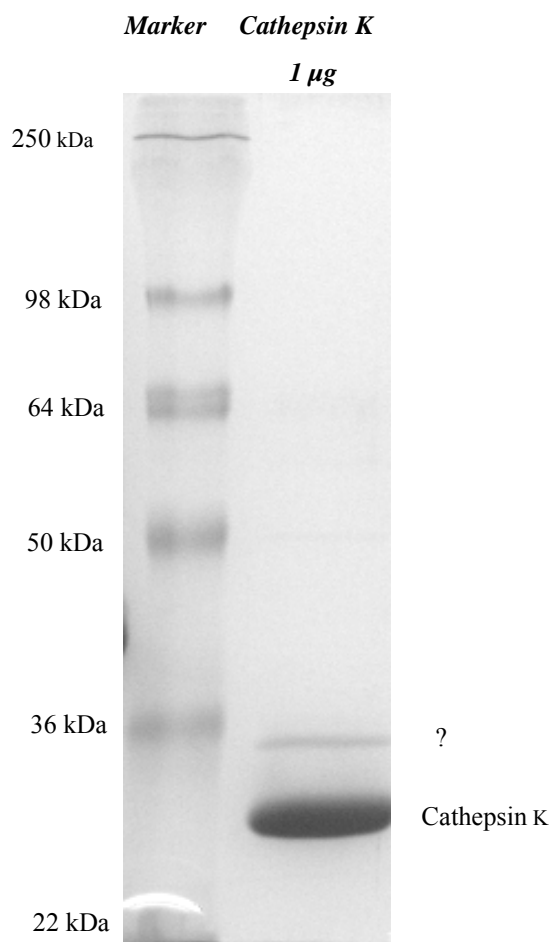


Abb.4: Elektropherogramm des Cathepsin K

Coomassiefärbung der SDS-Elektrophorese von 1 µg der Cathepsin K- Präparation. Durchführung mit einem 10 %igen Trenngel und einem 4,5 %igen Sammelgel. Die Elektrophorese lief mit 200 V über 45 Minuten. Marker: See Blue[®] Plus 2 Pre- Stained Standard.

Wie die Abbildung 4 zeigt, erkennt man eine sehr kräftige Bande im Bereich von ca. 27 bis 28 kDa, welche dem reifen Enzym entspricht. Man erkennt allerdings auch eine dünne Bande im Bereich von ca. 35 kDa. Diese könnte dem unreifen Procathepsin K entsprechen, wohl aber eher Prozessierungsintermediaten, wie sie zum Beispiel von Cathepsin L bekannt sind.

Zur weiteren Abklärung diente deshalb ein Western- Blot unter Verwendung des Antikörpers CK64-1C7, einem gegenüber Cathepsin K und Procathepsin K spezifischen monoklonalen IgM- Antikörper, der das Epitop: E226-I-P-E-G-N-E-K-A-L erkennt. Als sekundären Antikörper verwendeten wir einen Peroxidase- gekoppelten Antikörper gegen die schwere Kette des Maus- IgM, die Detektion erfolgte mit der ECL- Methode (Abbildung 5). Reste der Pro- Form in der verwendeten Cathepsin K- Präparation konnten durch dieses Experiment mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

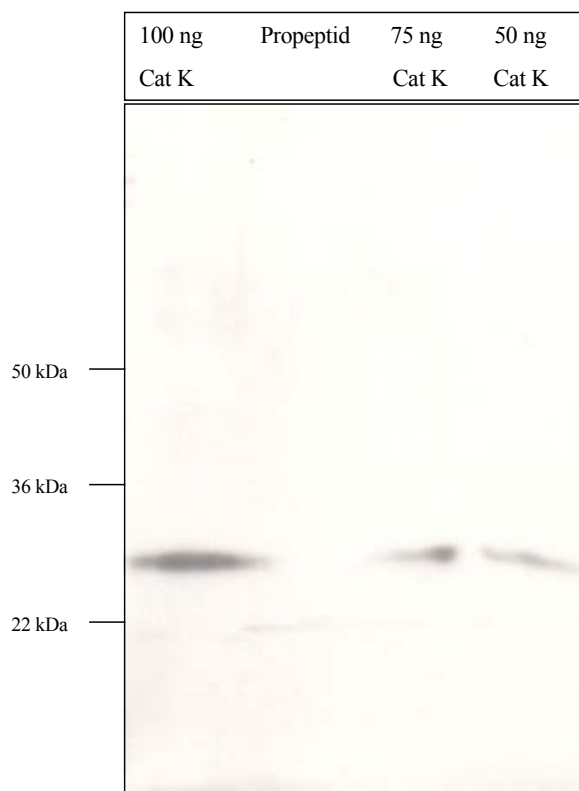


Abbildung 5: Western- Blot nach SDS- Gelelektrophorese von Cathepsin K

Auf ein 10 % iges Trenngel / 4,5 %iges Sammelgel wurden 50 ng, 75 ng und 100 ng der Cathepsin K- Präparation aufgetragen. Es erfolgte eine Elektrophorese mit anschließendem Western- Blot und Detektion des POD- gekoppelten Antikörpers mit der ECL- Methode (Durchführung siehe Methodenteil, Abschnitt 2.2.4 und 2.2.6.).

4.2. Optimierung des fluorometrischen Tests zur Cathepsin K- Bestimmung

Wie in der Zielstellung ausgeführt, sollte ein Verfahren gefunden werden, um die Aktivität von Cathepsin K im Gemisch mit dem inhibierenden Propeptid bestimmen zu können. Das Propeptid des Cathepsin K lagert sich reversibel so zwischen die beiden Domänen des Enzyms, dass es den Zugang des Substrates zum aktiven Zentrum blockiert. Umgekehrt verhindert die Substratbindung die Anlagerung des Propeptids. Einen solchen Mechanismus bezeichnet man als kompetitive Hemmung. Substrat und Inhibitor konkurrieren um die Bindung am Enzym, das normierte Konzentrationsverhältnis der konkurrierenden Liganden bestimmt das Ausmaß der Bindung und damit den Substratumsatz. Zur Normierung ist die Kenntnis der Bindungskonstanten von Substrat und Inhibitor an das Enzym, K_M bzw. K_i ,

erforderlich. Da die geplanten Aktivitätsmessungen zur Beurteilung des Renaturierungserfolges von Cathepsin K möglichst empfindlich sein sollten, ergaben sich bezüglich der Optimierung des Tests zwei Ziele, kleiner K_M -Wert und große katalytische Konstante (k_{cat}).

Ein praktikabler und gleichzeitig hochempfindlicher Test zur Bestimmung von Proteaseaktivität ist die fluorometrische Messung der AMC- Abspaltung von synthetischen Peptidsubstraten, die enzymkinetisch sehr gut zu charakterisieren ist. Die kinetischen Konstanten sind z. T. in Handbüchern gelistet. Für Cathepsin K fanden sich entsprechende Daten in einigen Originalarbeiten (Bossard, Tomaszek et al. 1996; Brömme, Okamoto et al. 1996; Linnevers, McGrath et al. 1997). Da sich die publizierten Testbedingungen aber z. T. erheblich unterscheiden und bisher keine vergleichenden Untersuchungen vorliegen, begannen wir mit Vorversuchen zur Abhängigkeit der Enzymaktivität von folgenden Parametern:

1. Puffersystem
2. pH- Wert
3. Konzentration des reduzierenden Agens: DTT vs. Cystein
4. DMSO- Konzentration
5. Art und Konzentration des Substrates

In vielen bisherigen Veröffentlichungen zur Bestimmung der Cathepsin K- Aktivität wird ein Azetattuffer verwendet, z. T. mit Zusatz von bis zu 10 % DMSO, um einer Präzipitation des Substrates vorzubeugen (Bossard, Tomaszek et al. 1996; McQueney, Amegadzie et al. 1997). Aber auch die Verwendung von Zitratpuffer wurde beschrieben (Billington, Mason et al. 2000). Da keine vergleichenden Messungen publiziert wurden, haben wir mit dem Vergleich zwischen Azetat- und Zitratpuffer begonnen. Abbildung 6 zeigt den Vergleich der Produktbildung bei 37 °C in Azetat- und Zitratpuffer, jeweils bei pH 4 und 5 unter ansonsten identischen Bedingungen. Erwartet wurden die Unterschiede der Anfangsgeschwindigkeiten zwischen den beiden pH- Werten, denn pH 4 liegt schon deutlich unterhalb des publizierten pH- Optimums. Unerwartet waren die Unterschiede zwischen den Puffermedien bei gleichem pH. Die Differenzen der Anfangsgeschwindigkeiten sind bei pH 4 signifikant, bei pH 5,0 nicht. Noch deutlicher sind die Unterschiede der Inaktivierungsgeschwindigkeit. Die Stabilität des Enzyms nimmt mit steigenden pH zu, im Zitratpuffer vermindert sich die Inaktivierungsgeschwindigkeit beispielsweise von 0.00287 s^{-1} bei pH 4,0 auf 0.0002524 s^{-1} bei pH 5,0, also um fast um eine Größenordnung. Azetattuffer ist diesbezüglich ungünstiger, die Inaktivierungsgeschwindigkeit ist bei pH 5,0 um den Faktor 1,67 höher als beim Zitratpuffer. Deshalb wurde Zitrat zur Pufferung im Bereich $3 \leq \text{pH} \leq 6$ eingesetzt.

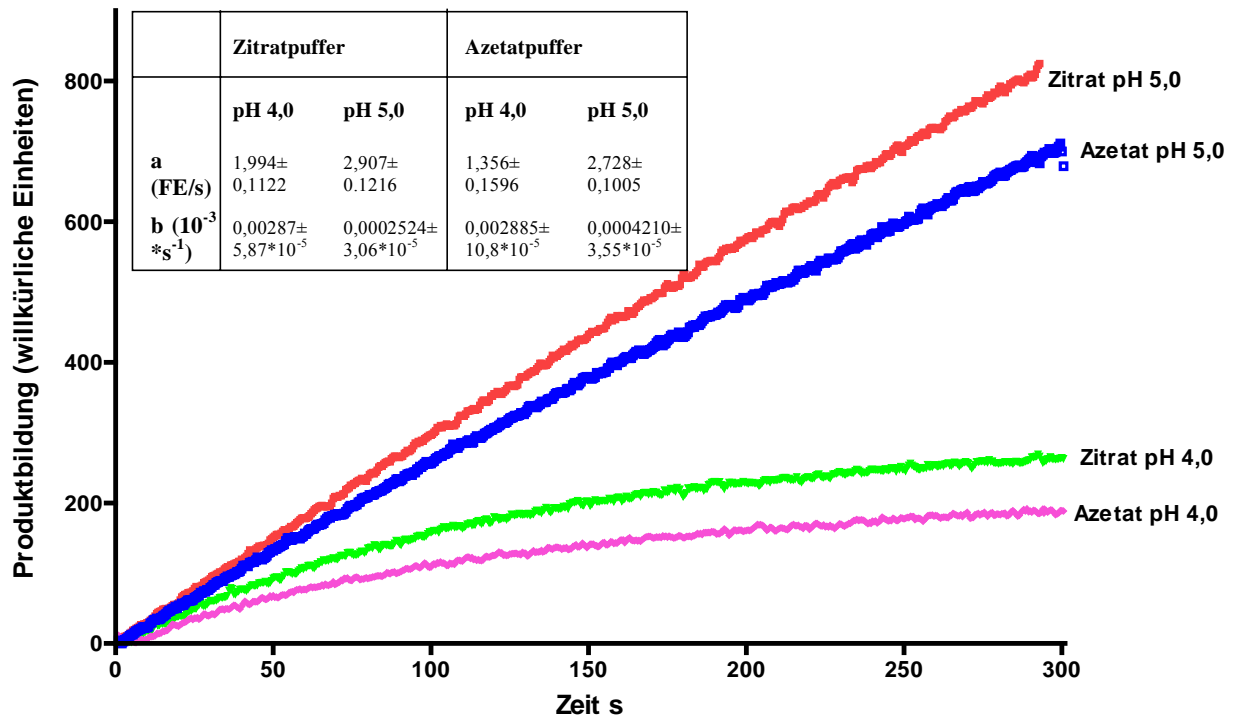


Abbildung 6: Vergleich der Aktivität und Stabilität von Cathepsin K in Zitrat- und Azetatpuffer. Das Testmedium hatte Standardzusammensetzung, als Puffersalz wurden 100 mM NaAz bzw. NaZi, eingestellt auf die jeweils angegebenen pH-Werte verwendet. Substratkonzentration 5 μ M Z-Leu-Arg-AMC, Enzymkonzentration 19,7 pM, Messtemperatur 37 °C. Dargestellt sind die Produktbildungs- Zeit- Kurven, aufgezeichnet mit dem Spektrofluorometer PE LS50B. Die Berechnung der im Inset tabellierten Anfangsgeschwindigkeiten (a) und Inaktivierungsgeschwindigkeiten (b) erfolgte mit Gleichung 2. Angegeben sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Messungen.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde der gesamte potentielle Messbereich $3 \leq \text{pH} \leq 8$ bei 20 °C und 37 °C bezüglich Anfangsgeschwindigkeit und Stabilität des Enzyms untersucht (Abbildung 7). Zur pH- Einstellung dienten Zitrat (pH 3,0, 4,0, 5,0 und 6,0), Phosphat (pH 6,0 und 7,0) und TRIS (pH 7,0 und 8,0). Die Überlappung der pH- Bereiche erlaubte die Normierung der Messungen, gleichzeitig ist so auch ein mittelbarer Vergleich mit den in Abbildung 6 gezeigten Daten möglich. Bei 20 °C Messtemperatur zeigt sich im pH- Aktivitätsprofil des Cathepsin K wie auch im Inaktivierungsprofil ein breites Aktivitätsoptimum zwischen pH 5,0 und 7,0, auch bei pH 4,0 beträgt die Aktivität noch über 70 % des Maximalwertes bei nur geringfügig erhöhter Inaktivierungsgeschwindigkeit. Ein weiteres Absenken des pH- Wertes führt allerdings zu einem raschen Anstieg der Inaktivierungsgeschwindigkeit des Enzyms. Bei pH 3,0 wird das Enzym praktisch augenblicklich inaktiviert. Auch im leicht alkalischen Bereich zeigt das Enzym bei einer

Messtemperatur von 20 °C eine erstaunlich gute Stabilität, bei pH 8,0 fanden wir noch ca. 80 % der Maximalgeschwindigkeit, bei ebenfalls nur geringfügig erhöhter Inaktivierungsgeschwindigkeit.

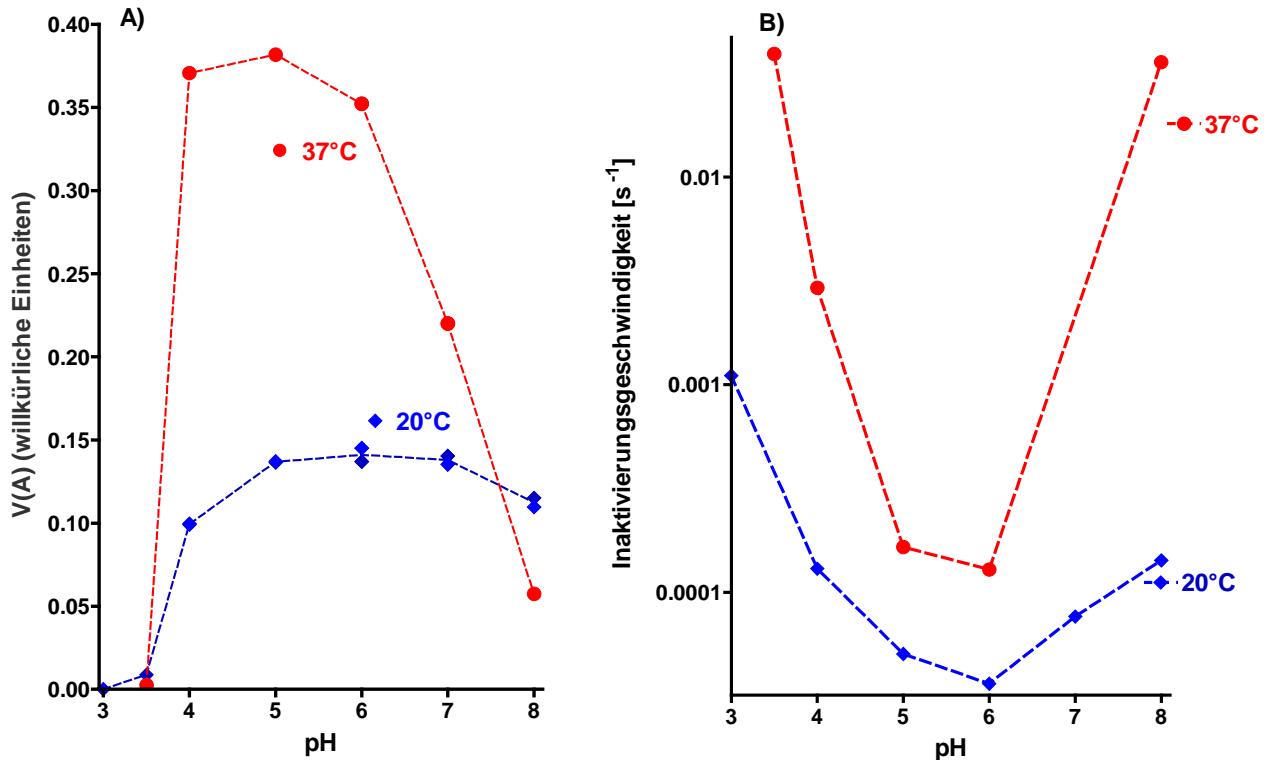


Abbildung 7: Einfluss von pH- Wert und Puffermedium auf die Cathepsin K- Aktivität:

Die Experimente wurden als Makrotest bei 20 °C und 37 °C in Standardtestmedium durchgeführt. Als Puffersalz dienten jeweils 100 mM NaZi, NaPa oder TRIS mit entsprechendem pH- Wert. Die Substratkonzentration betrug 18 μ M Z-Leu-Arg-AMC, Cathepsin K- Konzentration 3,08 pM. Aus den Produktbildungs-Zeit- Kurven wurden mit Gleichung 2 Anfangsgeschwindigkeit (a) (Abbildungsteil A) und Inaktivierungsgeschwindigkeit (b) (Abbildungsteil B, Ordinate logarithmisch) berechnet und als Funktion des pH- Wertes grafisch dargestellt.

Etwas anders ist die Situation bei 37 °C. Das Aktivitätsoptimum liegt zwischen pH 4,0 und 6,0, bei neutralem und leicht alkalischem pH ist der Abfall ausgeprägt. Nur in dem schmalen Bereich zwischen pH 5 und 6 ist das Enzym bei 37 °C stabil, beiderseits fanden wir eine teilweise bis zu 100fach höhere Inaktivierungsrate als bei 20 °C. Zusammenfassend aus beiden Versuchen kann man sagen, dass bei 20 °C Messtemperatur der pH- Bereich von 5,0 bis 7,0 für stabile Messungen zur Verfügung steht, selbst bei pH 4,0 ist bei dieser Temperatur die Inaktivierungsgeschwindigkeit noch vergleichsweise gering. Bei 37 °C hat man den Vorteil eines um den Faktor 3 höheren Signals, für stabile Messungen muss der pH- Wert jedoch zwischen 5,0 und 6,0 liegen.

Resultierend aus den präsentierten Versuchen und dem Ziel dieser Arbeit, Verfahren zu entwickeln, Cathepsin K- Aktivität möglichst empfindlich nachweisen zu können, setzten wir in fast allen folgenden Experimenten unabhängig von der Messtemperatur Zitratpuffer pH 5,0 als Standardpuffer ein. Abweichend verwendete Puffer werden an den entsprechenden Stellen gesondert gekennzeichnet.

Zur Stabilisierung der SH- Gruppe des Cysteinrestes im katalytischen Zentrum des Cathepsin K muss dem Testmedien ein reduzierendes Agens zugesetzt werden, üblich sind DTT (Brömme, Okamoto et al. 1996; Billington, Mason et al. 2000; McGrath, Sprengeler et al. 2003) und Cystein (Bossard, Tomaszek et al. 1996; McQueney, Amegadzie et al. 1997). Abbildung 8 zeigt, dass der Einfluss der DTT- Konzentration (1-10 mM) und Cystein- konzentration (5-20 mM) auf die Stabilität und Aktivität des Enzyms vergleichsweise gering ist. Erst über den ungewöhnlich langen Messzeitraum von einer Stunde zeigten sich geringe Unterschiede. Vergleicht man zunächst nur die Experimente, die den Einfluss der DTT- Konzentration untersuchen (Abbildungsteile 8A und 8B), erkennt man sowohl bei 20 °C als auch bei 37 °C einen geringen Vorteil in der Verwendung von 5 mM DTT.

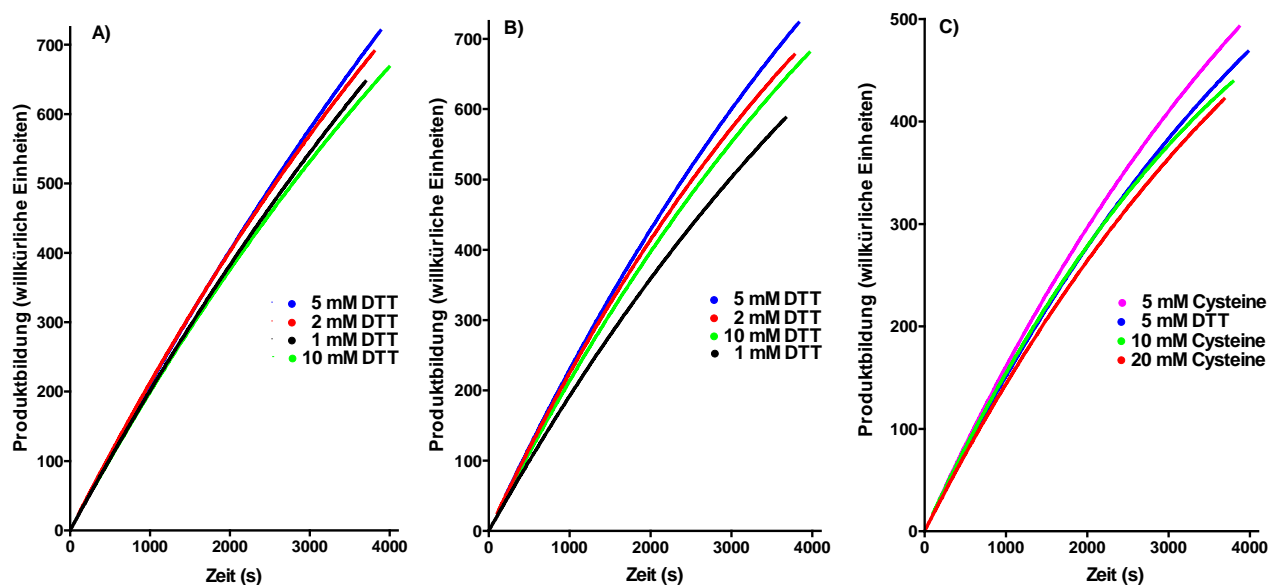


Abbildung 8: Einfluss von DTT und Cystein auf die Aktivität und Stabilität von Cathepsin K: Gemessen wurde in Standardpuffer mit 18 μ M Z-Leu-Arg-AMC, 1 % (20 °C) bzw. 0,36 % DMSO (37 °C), Variation von DTT bzw. Cystein. Dargestellt sind die Produktbildungs- Zeit- Kurven, Auswertung dieser mit Gleichung 2.

Abbildungsteil A: DTT- Zusatz bei 20 °C. Im Test befanden sich 0,0552 nM Cathepsin K.

Abbildungsteil B: DTT- Zusatz bei 37 °C. Im Test befanden sich 0,0276 nM Cathepsin K.

Abbildungsteil C: Cystein- Zusatz bei 37 °C. Im Test befanden sich 0,0184 nM Cathepsin K.

In Abbildung 8C wird diese optimale DTT- Konzentration noch mit drei unterschiedlichen Cysteinkonzentrationen verglichen. 5 mM Cystein könnte bezüglich der Anfangsgeschwindigkeit dem Zusatz von DTT minimal überlegen sein (es wurde keine Mehrfachbestimmung mit Signifikanzprüfung durchgeführt), die Inaktivierungsgeschwindigkeiten unterscheiden sich aber praktisch nicht ($8,341 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ mit 5 mM DTT, $8,115 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ mit 5 mM Cystein). Da in den meisten Veröffentlichungen DTT verwendet und dieses Agens in unserem Labor auch bei Arbeiten mit anderen Cathepsinen verwendet wird, wählten auch wir aus Gründen der Vergleichbarkeit für alle Experimente die optimale DTT- Konzentration von 5 mM.

Damit waren die Untersuchungen zu den am Anfang dieses Kapitels aufgelisteten Fragen 1 bis 3 mit eindeutigen Ergebnissen abgeschlossen.

Nachfolgend werden die Versuche zur Prüfung des Einflusses der DMSO- Konzentration und der Art und Konzentration des Substrates beschrieben: Die Substratspezifität von Cathepsin K wurde von zwei Arbeitsgruppen systematisch untersucht (Bossard, Tomaszek et al. 1996; Brömme, Okamoto et al. 1996; McQueney, Amegadzie et al. 1997). Übereinstimmend wurde für das Substrat Z-Leu-Arg-AMC das beste $k_{\text{cat}} / K_{\text{M}}$ - Verhältnis ermittelt, Z-Phe-Arg-AMC ist nur geringfügig schlechter, auch Z-Val-Arg-AMC wird noch mit gut messbarer Geschwindigkeit gespalten. Wir planten die Verwendung des wegen des Preisvorteils auch in den einschlägigen Publikationen fast ausschließlich verwendeten Substrates Z-Phe-Arg-AMC. Beim Literaturstudium wurde dann festgestellt, dass sich für dieses Substrat bezüglich der Werte für K_{M} und k_{cat} kein einheitliches Bild bot. Zwischen kleinsten und größten Wert lag fast eine Größenordnung, eventuell auch eine Folge der unterschiedlichen Versuchsbedingungen (Verwendung verschiedener Puffersalze in unterschiedlichen Konzentrationen, Variation des Test- pH- Wertes, der Temperatur und der Detergenz- Konzentration) (Bossard, Tomaszek et al. 1996; Brömme, Okamoto et al. 1996; Linnevers, McGrath et al. 1997; McGrath, Sprengeler et al. 2003). Das Literaturstudium erbrachte aber auch ein interessantes Ergebnis, Bossard und Mitarbeiter erwähnen in einer Fußnote eine geringe Substrathemmung durch Z-Phe-Arg-AMC und Z-Leu-Arg-AMC, geben aber keine K_{i} - Werte an. Sie schreiben nur allgemein von sehr hohen Konzentrationsbereichen, die in der Praxis keine Rolle spielen würden. Trotzdem haben wir eine solche Möglichkeit bei der Auswertung der eigenen Experimente später nicht aus den Augen verloren.

Weil AMC- Substrate in rein wässrigen Lösungen schlecht löslich sind, muss den entsprechenden fluorometrischen Tests DMSO oder ein anderes organisches Lösungsmittel zugesetzt werden. Bezüglich der zu diesem Zweck nötigen Konzentration gibt es aber keine systematischen Untersuchungen, die Angaben schwanken zwischen $<1 \%$ (Brömme,

Okamoto et al. 1996), 3 % (Billington, Mason et al. 2000) und 10 % (Bossard, Tomaszek et al. 1996).

Da die Ermittlung verlässlicher enzymkinetischer Daten für die Reaktion von Cathepsin K mit häufig genutzten Substraten sowohl im Rahmen der Zielstellung dieser Arbeit als auch allgemein von Interesse ist, wurden die Interaktion zwischen Cathepsin K und den drei nach Literaturangaben besten fluorogenen Substraten unter unseren Versuchsbedingungen systematisch untersucht. Diese Untersuchung wurde mit der Prüfung des DMSO- Einflusses kombiniert. Um Fehler durch den während der Messung unvermeidlichen Substratverbrauch und natürlich auch durch eine denkbare Produkthemmung auszuschließen, wurden die Fluoreszenzanstiege jeweils nur eine Minute lang beobachtet. In diesem Zeitraum wurde weniger als 1 ‰ des Substrates verbraucht, so dass die Berechnung der Anfangsgeschwindigkeit (v) aus den Primärdaten sehr genau durch lineare Regression erfolgen konnte. In Sekundärplots wurde dann $v = f([S])$ dargestellt.

Wir begannen aus den schon genannten Gründen mit der K_M - Bestimmung für Z-Phe-Arg-AMC, wobei sowohl die Substrat- als auch die DMSO- Konzentration systematisch variiert wurde. Abbildung 9 zeigt dazu beispielhaft einen repräsentativen Primärplot bei 37 °C und 3 % DMSO- Zusatz. Man erkennt schon in dieser Darstellung, dass es mit zunehmender Substratkonzentration nicht zu einem stetigen Zuwachs der Reaktionsgeschwindigkeit kommt. Die höchste Reaktionsgeschwindigkeit wird nicht bei der größten eingesetzten Substratkonzentration von 40 μM erzielt, sondern bei 25 μM . Dieses vielfach beobachtete Verhalten legt den Gedanken an eine Hemmwirkung des Substrates auf die Enzymaktivität nahe. Wären die entstehenden Produkte, AMC oder Z-Phe-Arg, für die Hemmwirkung verantwortlich, so würde es mit dem zeitabhängigen Anstieg der Produktkonzentration im kinetischen Test zu einer zunehmenden Hemmung kommen, die Kurven wären gekrümmt. Da jedoch die Kurvenverläufe auch bei längerer Beobachtung (bis zu 600 s) linear sind, muss diese Hemmung eine Eigenschaft des Substrates Z-Phe-Arg-AMC sein.

Substrathemmung wird in der Laborpraxis selten beobachtet, für Cysteinproteasen ist die schon mehrfach erwähnte Fußnote zur schwachen Hemmung von Cathepsin K durch die fluorogenen Substrate Z-Phe-Arg-AMC und Z-Leu-Arg-AMC der bisher einzige Hinweis (Bossard, Tomaszek et al. 1996). Mögliche Ursachen, speziell bei hydrolytischen Enzymen, sind in der Literatur schon umfassend dokumentiert. Darauf wird in der Diskussion näher eingegangen. Hier sollen jetzt die Beweise für die eben abgeleitete Arbeitshypothese angeführt werden, dass zumindest unter unseren experimentellen Bedingungen die Hemmung

von Cathepsin K durch AMC- Substrate schon in dem für eine zuverlässige K_M - Bestimmung zu untersuchenden Konzentrationsbereich nicht mehr zu vernachlässigen ist.

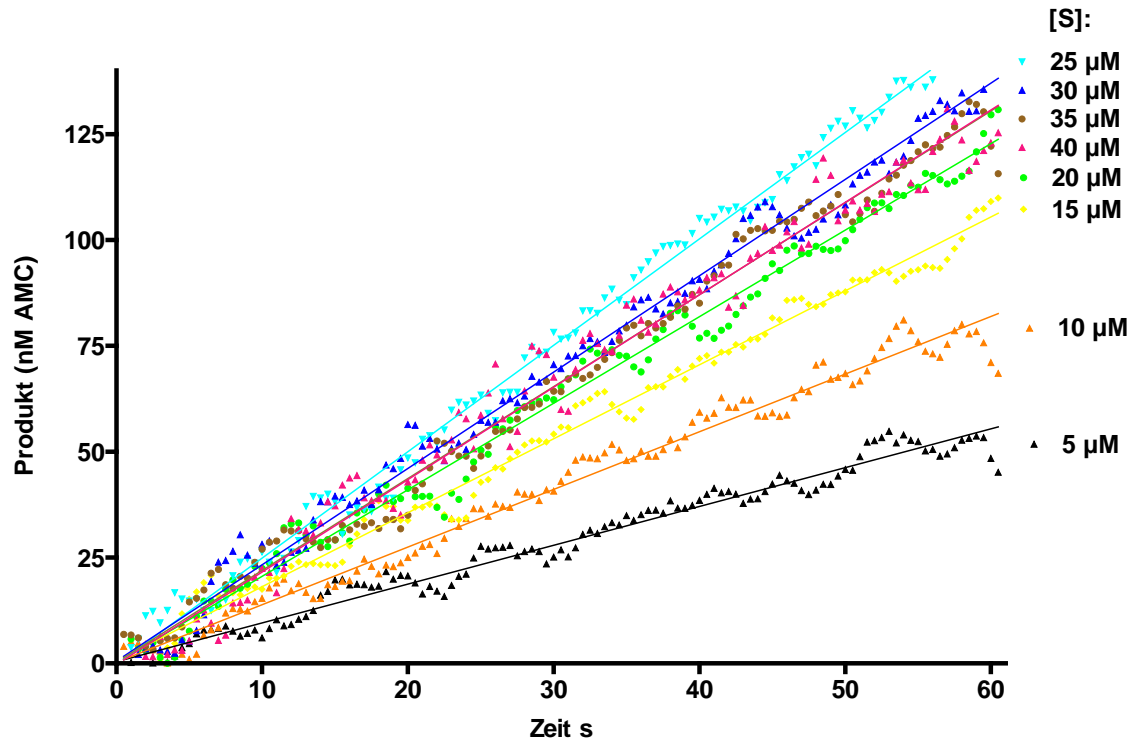


Abbildung 9: Primärdaten zum Bestimmung des K_M für Z-Phe-Arg-AMC bei 37 °C und 3 % DMSO im Test. Versuchsdurchführung und Auswertung wie im Methodenteil, Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben. Die Abbildung zeigt die gemessene AMC- Fluoreszenz als Funktion der Messzeit bei verschiedenen Substratkonzentrationen (Punkte).

Abbildung 10 zeigt je einen repräsentativen Sekundärplot für 20 °C und 37 °C aus insgesamt drei vergleichbaren Messreihen mit dem Substrat Z-Phe-Arg-AMC. Bei beiden Temperaturen ist eine starke Abhängigkeit der Cathepsin K- Aktivität von der DMSO- Konzentration zu erkennen. DMSO reduziert die Affinität des Substrates zum Cathepsin K, erkennbar an einer geringeren Cathepsin K- Aktivität bei gegebener Substratkonzentration. Die zugehörigen K_M - Werte sind in Tabelle 1 zusammengestellt. In den Sekundärplots ist die Substrathemmung daran zu erkennen, dass es bei Erhöhung der Substratkonzentration nicht zur Annäherung an V_{max} kommt, sondern dass es nach Überschreiten einer kritischen Konzentration, die in der Literatur als S_{opt} bezeichnet wird, wieder zum Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit kommt. Besonders in den Messungen bei 37 °C ist dieser Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit gut zu erkennen (Abbildung 10A).

Tabelle 1: K_M und kinetische Konstanten der verschiedenen Substrate bei 20 °C und 37 °C

	DMSO (%)	20 °C					37 °C				
		K_M (μM)	K_i (μM)	Korrektheit Substrathemmung	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat} / K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	K_M (μM)	K_i (μM)	Korrektheit Substrathemmung	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat} / K_M ($M^{-1}s^{-1}$)
Z-Phe-Arg-AMC	0,4	11,3 \pm 45,7%	*a	40,37%	23,6 \pm 28%	2,1*10 ⁶	24,1 \pm 22,6%	126 \pm 41%	99,09%	90,2 \pm 15,4%	3,7*10 ⁶
	1	19,0 \pm 58%	*a	4,48%	28,2 \pm 43,8%	1,5*10 ⁶	25,9 \pm 16%	203 \pm 40%	97,15%	76,4 \pm 10,9%	2,9*10 ⁶
	2	23,4 \pm 52,6%	35 \pm 72%	67,97%	26,9 \pm 38,9%	1,1*10 ⁶	37,3 \pm 23%	226 \pm 45%	96,40%	74,7 \pm 14,9%	2,0*10 ⁶
	3	30,5 \pm 59,6%	37 \pm 85%	60,22%	25,6 \pm 46,3%	0,84*10 ⁶	44,2 \pm 23,2%	188 \pm 46%	98,04%	70,7 \pm 17,4%	1,6*10 ⁶
	5						61,6 \pm 7,3%	*a	*b	64,8 \pm 2,6%	1,1*10 ⁶
	10						142,6 \pm 11,4%	*a	*b	74,0 \pm 6,2%	0,5*10 ⁶
Z-Leu-Arg-AMC	0,4	2,3 \pm 28,9%	118 \pm 34%	96,29%	27,5 \pm 7,9%	11,8*10 ⁶	4,2 \pm 20%	181 \pm 28%	99,85%	77,3 \pm 6,5%	18,5*10 ⁶
	1	4,1 \pm 26,4%	79 \pm 33%	98,67%	31,2 \pm 10,3%	7,6*10 ⁶	5,7 \pm 21,8%	170 \pm 32%	99,35%	82,6 \pm 8,3%	14,5*10 ⁶
	2	5,4 \pm 21,0%	62 \pm 26%	99,91%	33,5 \pm 9,6%	6,2*10 ⁶	7,6 \pm 24,2%	158 \pm 37%	98,51%	84,9 \pm 10,5%	11,2*10 ⁶
	3	6,8 \pm 19,0%	65 \pm 22%	>99,99%	33,6 \pm 9,0%	4,9*10 ⁶	11,4 \pm 20,9%	144 \pm 33%	99,64%	94,6 \pm 10,6%	8,3*10 ⁶
Z-Val-Arg-AMC	0,05-1,5	14,5 \pm 17%	475 \pm 54%	72,21%	8,3 \pm 9,5%	0,57*10 ⁶	14,2 \pm 15%	168 \pm 19%	>99,99%	10,1 \pm 7%	1,34*10 ⁶
	3,05-4,75	38,6 \pm 37%	318 \pm 65%	76,04%	9,4 \pm 22%	0,24*10 ⁶	34,0 \pm 23%	233 \pm 39%	99,45%	21 \pm 14%	0,62*10 ⁶

*a: Hier konnten keine ausreichenden Messungen im Bereich des abfallenden Schenkels der Kurven realisiert werden, aus diesem Grund sind die errechneten K_i - Werte nicht verwertbar.

*b: Für diese Experimente lieferte das Programm keine verlässlichen und reproduzierbaren Wahrscheinlichkeiten bezüglich der Korrektheit des Modells der Substrathemmung.

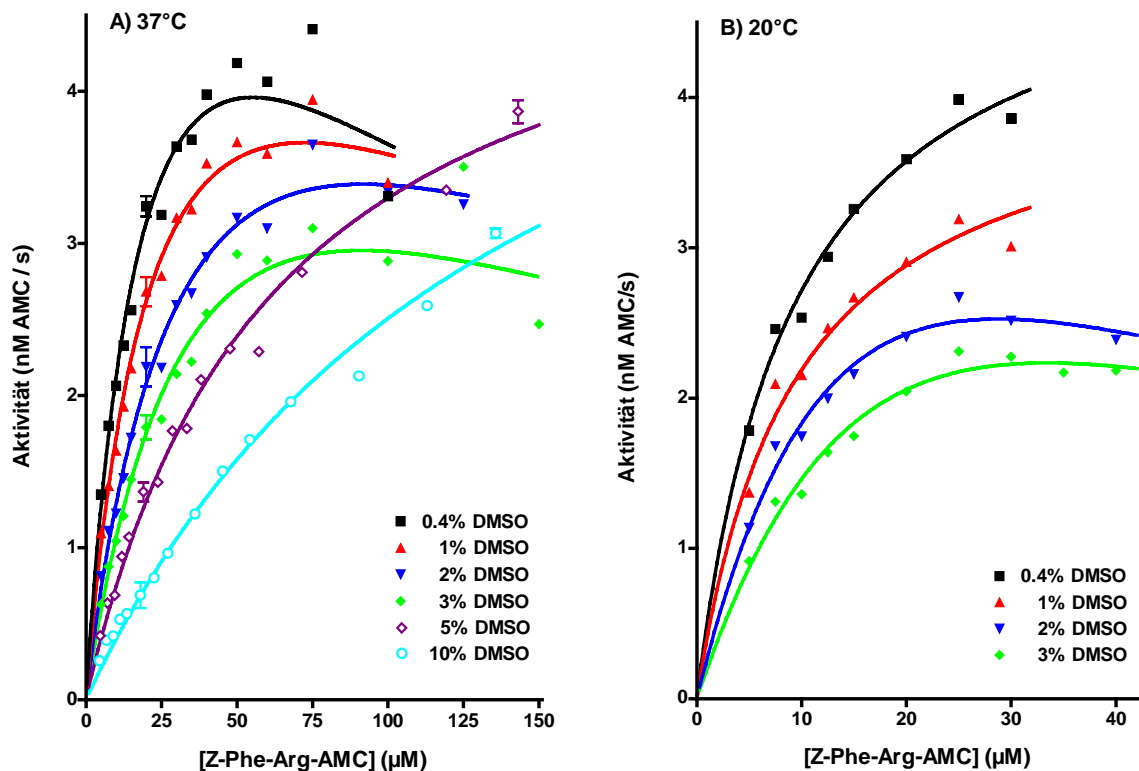


Abbildung 10: Bestimmung der kinetischen Konstanten für die Reaktion von Cathepsin K mit Z-Phe-Arg-AMC. Die Messungen erfolgten wie in Materialien und Methoden, Abschnitt 2.2.2.1. beschrieben, die Cathepsin K- Konzentration betrug bei 37 °C 0,082 nM (Abbildungsteil A), bei 20 °C 0,26 nM (Abbildungsteil B). Dargestellt sind die mit Gleichung 1 ermittelten Anfangsgeschwindigkeiten (vergleiche auch Abbildung 9) als Funktion der Substratkonzentration und der durch nichtlineare Optimierung der Parameter K_M , K_i und V_{max} in Gleichung 5 berechnete Kurvenverlauf.

Durch nichtlineare Regressionsanalyse unter Verwendung von Gleichung 5 (Methodenteil) konnten V_{max} , K_M und K_i berechnet werden. Dies war bei 37 °C und mittlerer DMSO-Konzentration vergleichsweise gut möglich. 5 % und 10 % DMSO im Test verringern die Affinität des Substrats zum Enzym sowohl in der produktiven als auch in der unproduktiven Orientierung sehr stark. Das heißt, dass sich sowohl K_M als auch K_i vergrößern und nur noch unsicher oder überhaupt nicht mehr zu bestimmen sind. In den Versuchen mit hoher DMSO-Konzentrationen ist beispielsweise überhaupt keine Aussage zum K_i mehr möglich, die publizierte Beobachtungen von Bossard und Mitarbeiter beweisen aber, dass die Substrathemmung auch bei 10 % DMSO im Test noch nicht völlig verschwindet. Eigene Untersuchungen mit noch höheren Substratkonzentrationen, die durch extrem hohen DMSO-Zusatz in Lösung gehalten werden müssten, waren im Rahmen der Fragestellung nicht mehr interessant.

Da Routinemessungen bei 37 °C in anderen Labors eher die Ausnahme sind und aus Gründen der Praktikabilität meist einfach bei Raumtemperatur gearbeitet wird, haben wir die Untersuchungen zur Substrathemmung auch bei 20 °C durchgeführt. Die Ergebnisse werden in Abbildungsteil 10B veranschaulicht. Die Auswertung dieser Versuche ist wegen des begrenzten Konzentrationsbereiches (Vergleich der Abszissen der Abbildungsteile A und B) sehr unsicher. Der Grund sind Aktivitätsverluste, die über das erwartete Maß der Substrathemmung hinausgingen und ab 35 μM Substratkonzentration häufig beobachtet wurden. Sie sind hier nicht mit dargestellt, wurden aber in Abbildung 14 aufgenommen, zusammen mit Zusatzversuchen, die methodische Fehler als Ursache der abfallenden Geschwindigkeit bei ansteigender Substratkonzentration ausschließen sollen.

Diese Ergebnisse des Versuchs einer K_M - Bestimmung für Z-Phe-Arg-AMC machten nachdrücklich klar, dass dieses Substrat für den vorgesehenen Zweck unbrauchbar ist. Deshalb wurden auch die beiden anderen in der zitierten Publikation genannten Substrate des Cathepsin K in ähnlicher Weise untersucht. Abbildung 11 veranschaulicht zunächst die Ergebnisse für die Messungen mit Z-Leu-Arg-AMC.

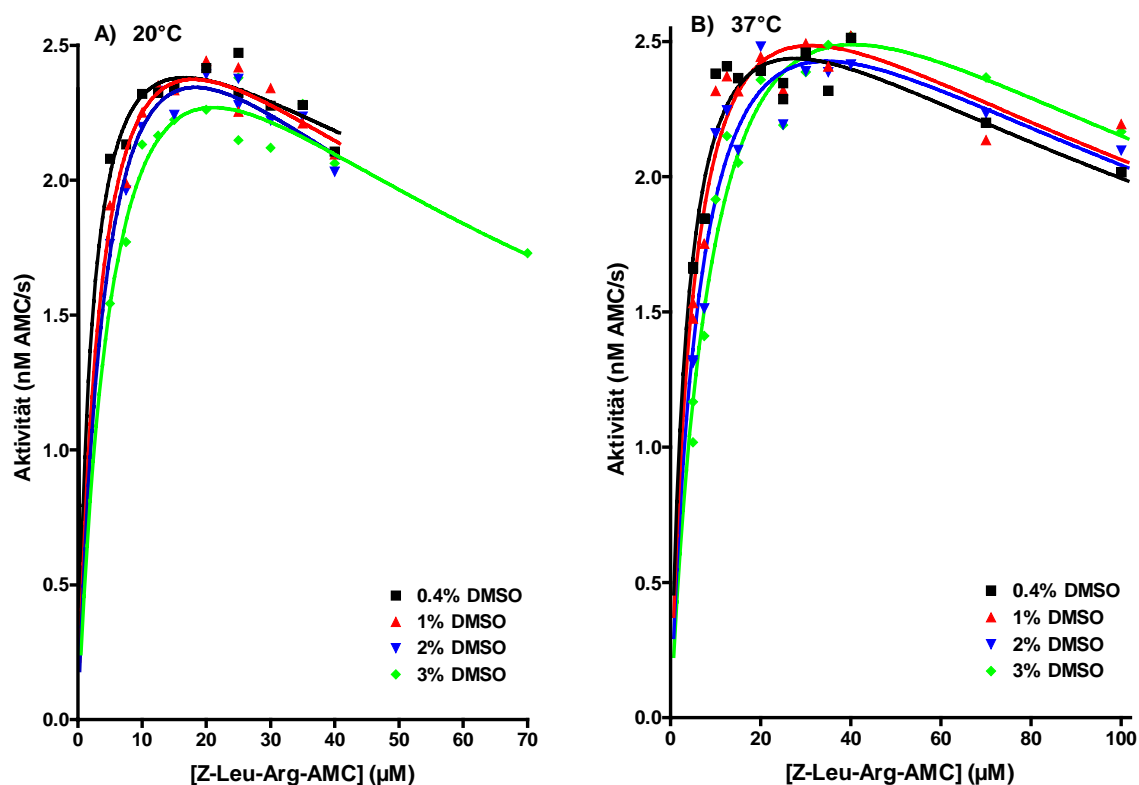


Abbildung 11: Bestimmung der kinetischen Konstanten für die Reaktion von Cathepsin K mit Z-Leu-Arg-AMC. Die Versuchsdurchführung und Auswertung erfolgte wie in Materialien und Methoden, Abschnitt 2.2.2.1. beschrieben. Die Cathepsin K- Konzentration betrug bei 37°C 0,041 nM (Abbildungsteil B), bei 20 °C 0,11 nM (Abbildungsteil A).

Auch Z-Leu-Arg-AMC zeigt eine Substrathemmung, im Vergleich zu Z-Phe-Arg-AMC (Abbildung 10) werden jedoch zwei wichtige Unterschiede deutlich:

1. Die Hemmung ist deutlich moderater als bei Z-Phe-Arg-AMC, die Beschreibung der Messpunkte mit Gleichung 5 ist besser möglich, die K_i -Werte sind damit v.a. bei 20 °C sicherer bestimmbar (Vergleiche auch Tabelle 1).
2. Z-Leu-Arg-AMC hat eine höhere Affinität zum Cathepsin K, die K_M -Werte sind deutlich kleiner.

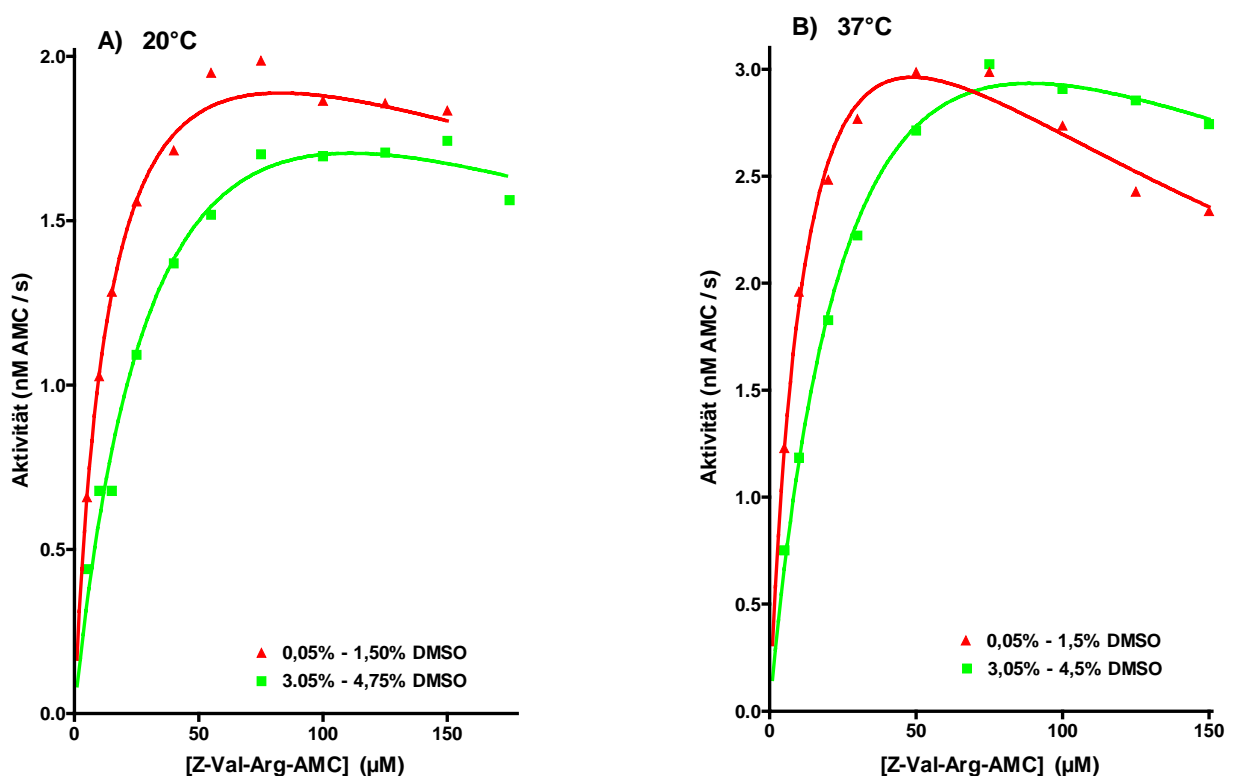


Abb. 12: Bestimmung der kinetischen Konstanten für die Reaktion von Cathepsin K mit Z-Val-Arg-AMC. Die Messungen erfolgten mit dem LS 50 B Luminescence Spectrometer im Standardtestpuffer, Enzymkonzentration bei 20°C 0,31 nM (Abbildungsteil A), bei 37 °C 0,25 nM (Abbildungsteil B). Die Versuchsdurchführung wurde hier im Vergleich zu dem bei den Abbildungen 10 und 11 beschriebenen Vorgehen vereinfacht: für die DMSO- Konzentration im Test wurden Bereiche von maximal 1,7 % Breite zugelassen. In der rot dargestellten Testreihe enthielt das Medium nur das zur Lösung des Substrats (10 mM) verwendete DMSO (0,05 – 1,5% Endkonzentration), bei der blau dargestellten lag die Anfangskonzentration bei 3%, die sich dann durch Substratzugabe bis auf 4,75% erhöhte. Die Auswertung erfolgte wie bei den bereits beschriebenen Versuchen (Abbildungen 9 bis 11).

Als drittes Substrat wurde noch Z-Val-Arg-AMC untersucht. Die in Abbildung 12 zusammengestellten Versuche zeigen, dass auch dieses Substrat das Enzym inhibiert, allerdings erst in sehr hohen Konzentrationen. Affinität zum Cathepsin K und k_{cat} sind

deutlich geringer als bei den beiden anderen Substraten (Tabelle 1). Da wir ein Substrat mit möglichst kleinem K_M und großer katalytischer Konstante suchten, schied Z-Val-Arg-AMC für die geplante Verwendung aus. Deshalb wurde auch auf eine genauere Untersuchung der Abhängigkeit von der DMSO- Konzentration verzichtet.

Insbesondere bei den 37 °C Messungen mit dem Substrat Z-Leu-Arg-AMC sind die hohen Substratkonzentrationen nur gering besetzt, der Abfall der Aktivität durch die zunehmende Hemmung ist nur durch wenige Messpunkte belegt. Aus diesem Grund wurde die Versuchsreihe bei 37°C mit Z-Leu-Arg-AMC und 1 % DMSO unter Einbeziehung mehrerer Messungen im hohen Konzentrationsbereich wiederholt und gleich noch eine zweite Frage mit untersucht: Welchen Einfluss hat die Ionenstärke auf die Substrathemmung? Dazu wurde unter ansonsten identischen Bedingungen dem Testmedium 400 mM NaCl zugesetzt. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 13.

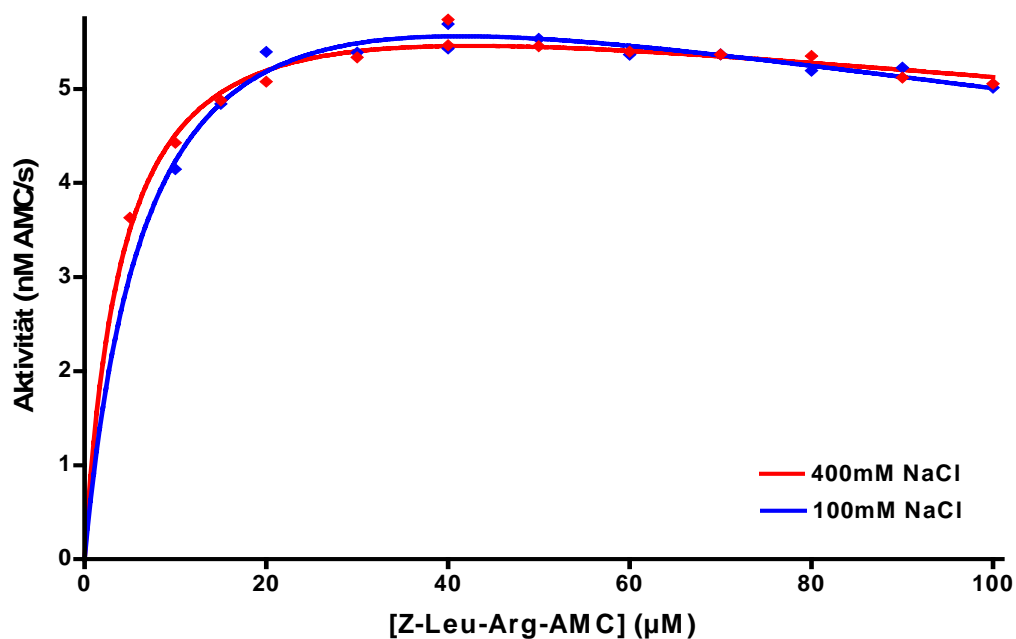


Abbildung 13: Einfluss der Ionenstärke auf die Reaktion von Cathepsin K mit Z-Leu-Arg-AMC. Analog zu den in Abbildung 11 beschriebenen Experimenten wurde mit dem Substrat Z-Leu-Arg-AMC und 1 % DMSO im Standardtestpuffer gearbeitet. Unterschiedlich waren die Kochsalzkonzentration, im Kontrollversuch 100 mM, im Parallelversuch 400 mM. Die Enzymkonzentration lag bei 0,082 nM. Die Messungen fanden bei 37 °C statt. Die Berechnung der eingezeichneten Kurven erfolgte nach Gleichung 5.

In Übereinstimmung mit Abbildung 11 sieht man den Abfall der Enzymaktivität bei hohen Substratkonzentrationen infolge der Substrathemmung. Ein Einfluss der Ionenstärke des

Testmediums auf die Kinetik des Substratumsatzes ist in diesem Experiment allerdings nicht zu erkennen.

Die in den Abbildungen 9 bis 13 zusammengestellten Experimente sprechen für eine Substrathemmung durch die drei nach übereinstimmenden Literaturdaten besten fluorogenen Peptidsubstrate des Cathepsin K. Insbesondere die Tatsache, dass dieses Phänomen nicht in allen einschlägigen Veröffentlichungen beschrieben wurde und quantitative Aussagen völlig fehlen, veranlasste zu Zusatzuntersuchungen, die eine Fehlinterpretation unserer Beobachtungen ausschließen sollten. Da ist vor allem an die Präzipitation der schlecht wasserlöslichen Substrate in der Küvette zu denken, das würde den Umsatzverlust zwanglos erklären. Deshalb wurde am Ende jeder fluorometrischen Messung durch eine turbidometrische Messung nach Substratpräzipitation gesucht. Eine eventuell auftretende messbare Trübung im sichtbaren Spektralbereich führte zum Ausschluss des fluorometrischen Ergebnisses von der weiteren Auswertung und zum Abbruch der entsprechenden Messreihe bei dieser Konzentration. Auch der positive Beweis, dass nämlich das Substrat in Lösung bleibt und für Enzyme zugänglich ist, gelang an einem besonders eindrucksvollen Beispiel (Abbildung 14). In Abbildung 10B wurde gezeigt, dass bei 20 °C die Hemmwirkung von Z-Phe-Arg-AMC gegenüber Cathepsin K am deutlichsten zu beobachten ist. Da Z-Phe-Arg-AMC auch sehr gut durch Cathepsin L umgesetzt wird, lag es nahe, unter identischen Bedingungen die Aktivität dieses Enzyms zu messen. In Abbildung 14 werden die Ergebnisse verglichen. Man erkennt, dass bei Substratkonzentrationen, die bei Cathepsin K bereits zu einem deutlichen Aktivitätsverlust führen, beim Cathepsin L noch eine regelrechte Michaelis-Menten-Kinetik beobachtet wird. Dieses Experiment belegt, dass nicht physikochemische Probleme die Ursache für den Aktivitätsabfall sind, sondern dass es sich hier tatsächlich um ein biochemisches Phänomen handelt, verursacht durch spezifische Wechselwirkungen zwischen dem Substrat und Cathepsin K. Abbildung 14 soll noch ein weiteres Problem veranschaulichen: den Unterschied zwischen Reaktionen ohne Substrathemmung und Reaktionen mit Substrathemmung bezüglich der Relation zwischen erreichter (v) und maximaler Geschwindigkeit (V_{\max}). Deshalb wurde die Ordinate mit v / V_{\max} skaliert. Man erkennt, dass bei Cathepsin L die relative Enzymaktivität v / V_{\max} gegen 1 geht, während Cathepsin K deutlich darunter bleibt. Das liegt daran, dass bei Substrathemmung immer zwei Reaktionen nebeneinander ablaufen, der Umsatz des Substrates zum Produkt und die Hemmung der Enzymaktivität durch das Substrat. Damit ist V_{\max} für solche Reaktionen eine fiktive Größe, es wird nur die optimale Geschwindigkeit v_{opt} bei einer optimalen Substratkonzentration $[S_{\text{opt}}]$ erreicht.

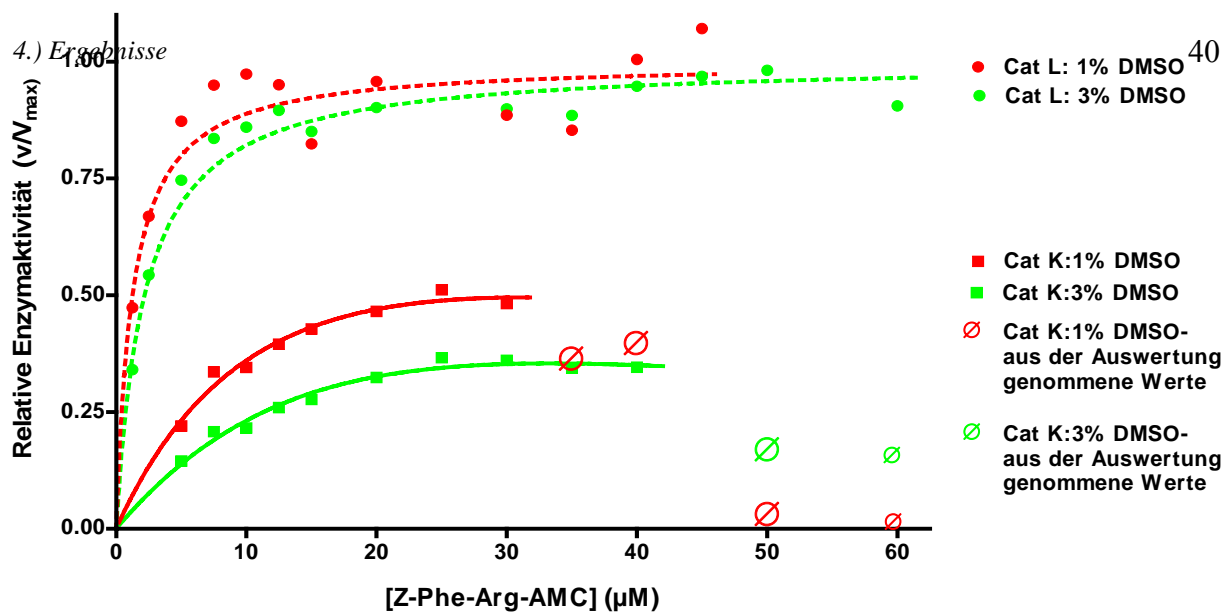


Abbildung 14: Vergleichende Messung von Cathepsin L und Cathepsin K mit Z-Phe-Arg-AMC. Die Messungen erfolgten wie in der Legende zu Abbildung 10 beschrieben im Standardtest mit 1 % bzw. 3 % DMSO und Z-Phe-Arg-AMC als Substrat bei 20 °C. Dargestellt ist die relative Enzymaktivität v / V_{\max} in Abhängigkeit von der Substratkonzentration für Cathepsin L und Cathepsin K. Die Ergebnisse für Cathepsin K stammen aus Abbildung 10, die dort eliminierten Daten sind hier mit eingezeichnet.

Ein zweiter Ansatz zum schlüssigen Nachweis der Substrathemmung geht von folgender Überlegung aus: Bei kontinuierlicher Messung der Produktbildung während des Umsatzes einer hohen Substratkonzentration durch Cathepsin K wird mit zunehmendem Substratverbrauch die Inhibition geringer und die Reaktionsgeschwindigkeit müsste anfangs geringfügig ansteigen. Ein solches Verhalten wäre bei einem Enzym mit einfacher Michaelis-Menten-Kinetik nie zu beobachten. Allerdings war auch hier die Substratlöslichkeit der limitierende Faktor bezüglich der realisierbaren Konzentrationen. Die Messung des Umsatzes von Z-Leu-Arg-AMC bei Raumtemperatur erschien deshalb für diese Art der Beweisführung besonders gut geeignet, da hier K_M und K_i deutlich unterhalb der Löslichkeitsgrenze des Substrates liegen (Tabelle 1). Im oberen Teil von Abbildung 15 ist der Zeitverlauf der Produktbildung unter diesen Bedingungen dargestellt, in Teil A für das gesamte Experiment, in Teil B für die entscheidenden ersten Sekunden. Der beweisende zeitabhängige Aktivitätsanstieg bei 60 und 80 μM Substrat, im Vergleich zu 20 und 40 μM , ist nicht zu übersehen. Die mathematische Auswertung der vier in Teil A dargestellten Kurven ergab einen K_M von 2,9 μM und einen K_i von 119 μM , bei 37°C waren es 7,6 bzw. 129 μM .



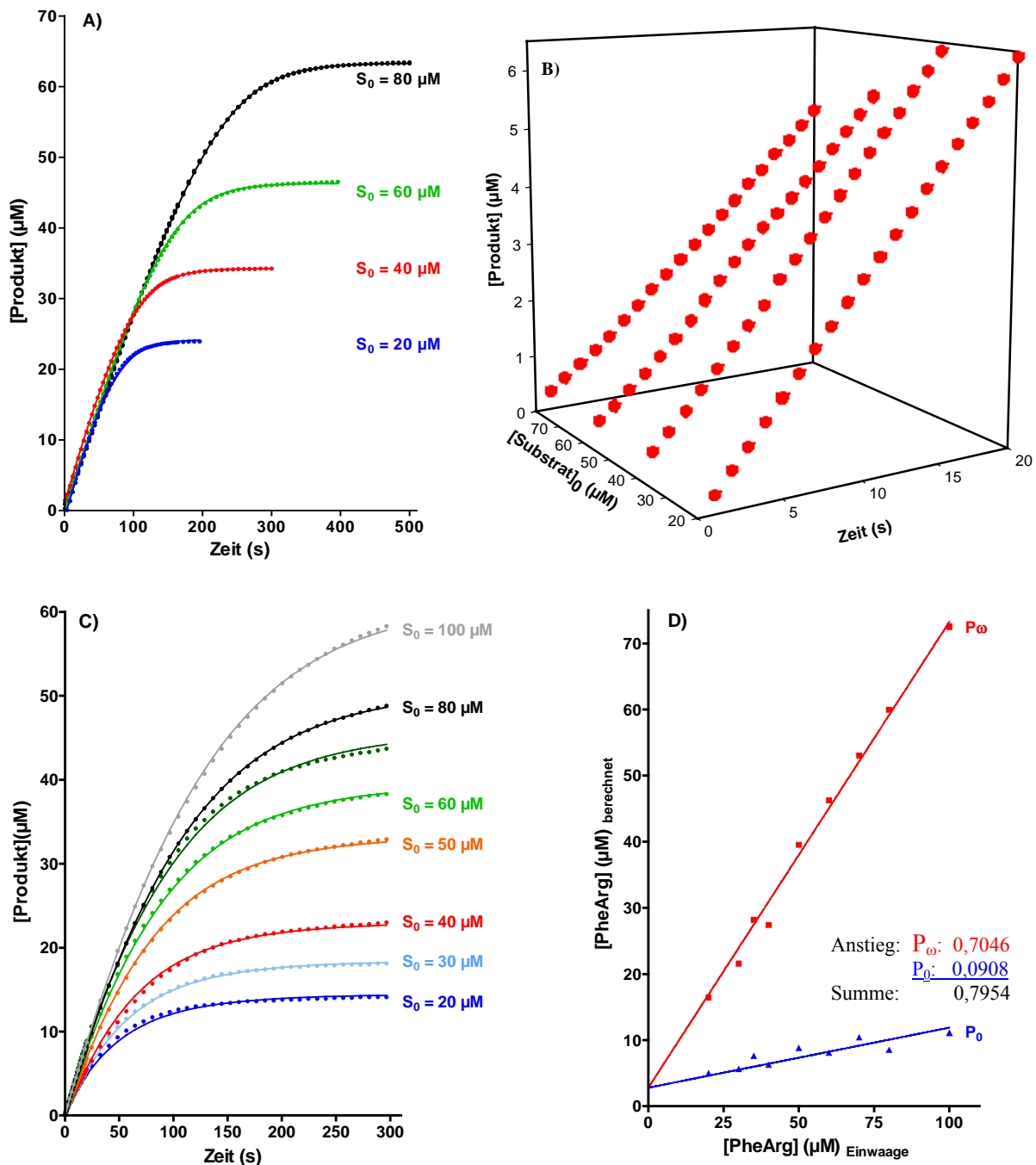


Abbildung 15: Zeitverlauf der Totalhydrolyse von Z-Phe-Arg-AMC und Z-Leu-Arg-AMC durch Cathepsin K: Die Messungen erfolgten mit dem Beckman-Photometer bei 360 nm unter Verwendung von Halbmikroküvetten mit 1 cm Schichtdicke in Standardtestpuffer pH 5,0. Die angegebenen Substratkonzentrationen (S_0) basieren auf den eingewogenen Mengen, die Reaktion wurde durch Zugabe von 6,15 nM Cathepsin K gestartet. Die Auswertung wird in Materialien und Methoden, Abschnitt 2.2.2.1. (Gleichungen 8 – 10) ausführlich beschrieben.

Abbildungsteil A: Vollständiger Umsatz von Z-Leu-Arg-AMC bei Raumtemperatur.

Abbildungsteil B: Anfangsphase aus Abbildungsteil A.

Abbildungsteil C: Vollständiger Umsatz von Z-Phe-Arg-AMC bei 37°C.

Abbildungsteil D: Sekundärplot zu Abbildungsteil C, die errechneten Werte für P_0 und P_∞ sind als Funktion von S_0 dargestellt.

Der untere Teil von Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse mit Z-Phe-Arg-AMC bei 37°C. Der aus den Primärdaten (Teil C) errechnete K_M beträgt 20,7 µM. Obwohl auch hier die

Anfangsabschnitte der Kurven mit 80 und 100 μM Substrat Sigmoidizität zeigen, wurde K_i vom Programm nicht sicher bestimmt. In Vorversuchen bei Raumtemperatur kam es wegen der begrenzten Löslichkeit von Z-Phe-Arg-AMC schon bei Konzentrationen kleiner als 40 μM zur Präzipitation, erkennbar an einem sprunghaften Anstieg der Anfangsabsorbanz. Diese Serie wurde deshalb abgebrochen. Aus zwei Messungen mit 100 bzw. 200 μM Z-Val-Arg-AMC bei Raumtemperatur ergab sich ein K_M von 17,9 μM , auch in diesem Fall war ein K_i nicht sicher zu bestimmen (nicht gezeigt).

Da in den Progressversuchen das Substrat vollständig in die Produkte gespalten wurde, ergab sich bei der Auswertung unter Verwendung Absorbanzkoeffizienten für AMC die Möglichkeit der Kontrolle der Konzentrationen der benutzten Substratstammlösungen. Abbildung 15 D illustriert das Vorgehen am Beispiel von Z-Phe-Arg-AMC. Dargestellt sind die aus den Primärdaten (Teil C) errechneten Produktkonzentrationen zum Zeitpunkt null (P_0) und unendlich (P_∞) als Funktion der aus der Einwaage errechneten anfänglichen Substratkonzentration. Im Idealfall wären Anstiege von null bzw. eins zu erwarten, d.h. die Substratstammlösung ist 100 % rein und die Registrierung beginnt sofort mit Beginn der Reaktion. Das ist offensichtlich nicht der Fall, für die verwendete Z-Phe-Arg-AMC Stammlösung ergibt sich als Summe der Anstiege beider Geraden ein Wert von 0,8 als Quotient zwischen erwarteter und errechneter Konzentration. Vergleichbare Auswertungen der Versuche mit Z-Leu-Arg-AMC und Z-Val-Arg-AMC ergaben sogar nur jeweils 0,7. Da alle einschlägigen publizierten Daten offensichtlich auf einer Konzentrationsbestimmung durch Einwaage basieren, wurde auf eine generelle Korrektur der bisher in dieser Arbeit präsentierten Daten verzichtet. Beim Vergleich der Ergebnisse der Progressversuche mit den Ergebnissen aus den Standardversuchen (Tabelle 2) muss diese Differenz aber berücksichtigt werden. Dann ergibt sich für die K_M Werte zum Teil eine sehr gute Übereinstimmung zwischen beiden Methoden (z.B. Z-Phe-Arg-AMC mit 1 % DMSO bei 37°C: Progresskurven $20,7 / 0,8 = 25,88 \mu\text{M}$; Tabelle 1: 25,9 μM).

Auch mit statistischen Verfahren ist die Substrathemmung zu belegen. Das zur Versuchsauswertung genutzte Programm „Prism 4.0“ ermöglicht den Vergleich der Ergebnisse von nichlinearen Regressionanalysen mit zwei verschiedenen Modellgleichungen für die gleichen Messwerte. Berechnet wird die Wahrscheinlichkeit, mit der die jeweilige Modellgleichung korrekt ist (siehe auch Methodenteil). Für alle in den Abbildungen 10 bis 13 präsentierten Kurven wurde das Modell mit Substrathemmung (Gleichung 5) mit dem einfachen Michaelis- Menten- Modell verglichen (Gleichung 4). Die Ergebnisse sind in

Tabelle 1 in der Spalte „Korrektheit Modell Substrathemmung“ gelistet. Man erkennt, dass das Programm für fast alle Bedingungen das Modell der Substrathemmung als das bevorzugte Modell beschreibt, für die meisten liegt die Korrektheit des Modells sogar über 90 %. Lediglich die Verwendung von Z-Phe-Arg-AMC bei 20 °C führt bei niedriger DMSO-Konzentration zu einer Bevorzugung des einfachen Michaelis- Menten- Modells. Wie bereits ausführlich beschrieben (Abbildung 14), war das genau die Versuchsreihe, in der die zur zuverlässigen Bestimmung von K_i notwendigen Messungen bei höheren Substratkonzentrationen nicht realisiert werden konnten. Um Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden aber auch diese Experimente mit dem Modell der Substrathemmung ausgewertet.

In allen in den Abbildungen 9 bis 13 dargestellten Versuchen zur Messung von $v = f([S])$ wurde die DMSO- Konzentration systematisch variiert. Unabhängig vom Substrat wurde ein Einfluss von DMSO auf die Enzymaktivität sichtbar. Bei genauerer Betrachtung stellten wir fest, dass es bei allen Substraten mit Erhöhung der DMSO- Konzentration zu einem Anstieg des K_M kommt (Abbildung 16). DMSO verringert also die Affinität des Substrates zum Cathepsin K.

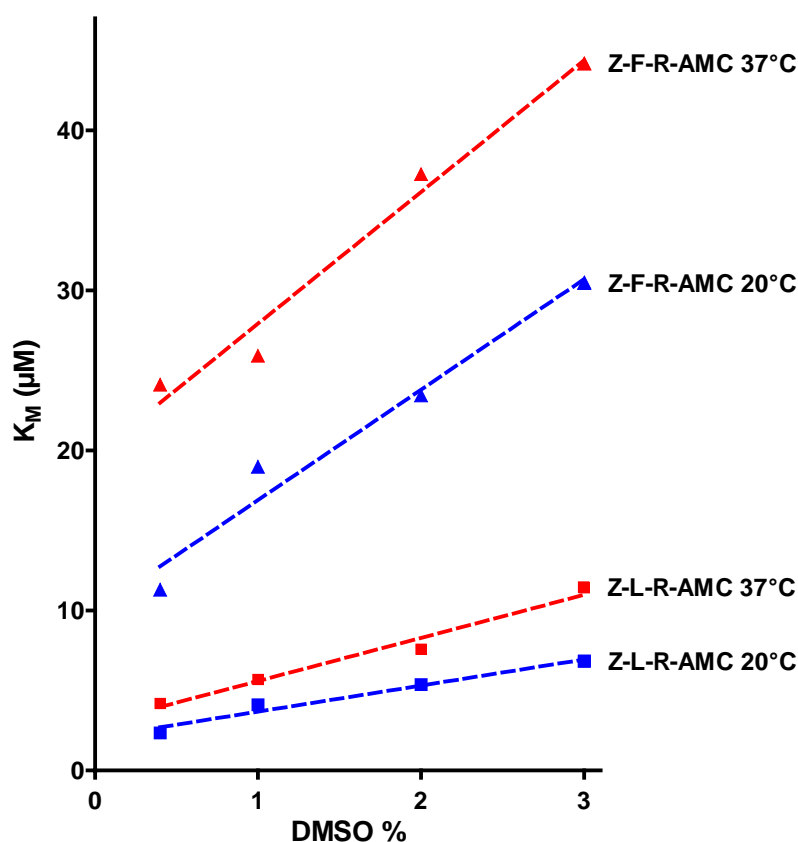


Abbildung 16: Einfluss der DMSO Konzentration auf die Affinität von Cathepsin K zu seinen Substraten. Die aus den Daten der in den Abbildungen 10 und 11 gezeigten Experimente mit Gleichung 6 errechneten Werte für K_M sind als Funktion der DMSO-Konzentration im Test dargestellt.

Beim Vergleich der Maximalgeschwindigkeiten wurde demgegenüber kein Trend beobachtet. Die Unterschiede zwischen den für die einzelnen Bedingungen ermittelten V_{\max} -Werten liegen im Bereich des Messfehlers. Ein Einfluss des DMSO auf die Maximalgeschwindigkeit besteht also nicht. Das geht mittelbar aus der Größe der Fehlerbalken in Abbildung 17 hervor, die unter Vernachlässigung der unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen V_{\max} für unterschiedliche Temperaturen und Substrate veranschaulicht. Diese Ergebnisse können naturgemäß nur Schätzwerte sein, denn Reaktionen, die Substrathemmung aufweisen, laufen höchstens mit optimaler Reaktionsgeschwindigkeit ab. Da diese oft erheblich unter der aus dem Kurvenverlauf zu erwartenden Maximalgeschwindigkeit liegt, muss unter Berücksichtigung von K_M und K_i hochgerechnet werden. K_M und K_i ihrerseits ergeben sich aus den Messwerten im auf- und absteigendem Schenkel der $v = f([S])$ -Kurven und hängen damit von der Möglichkeit der Realisierung von verlässlichen Messungen in den betreffenden Konzentrationsbereichen ab. Da dieses Kriterium in einigen Versuchsreihen mit Z-Phe-Arg-AMC im Test nicht erfüllt wurde (20 °C: 0,4 % und 1 % DMSO im Test und 37 °C: 5 % und 10 % DMSO im Test), stellen dann die mit Gleichung 5 ermittelten K_i - und V_{\max} -Werte nur Näherungswerte dar.

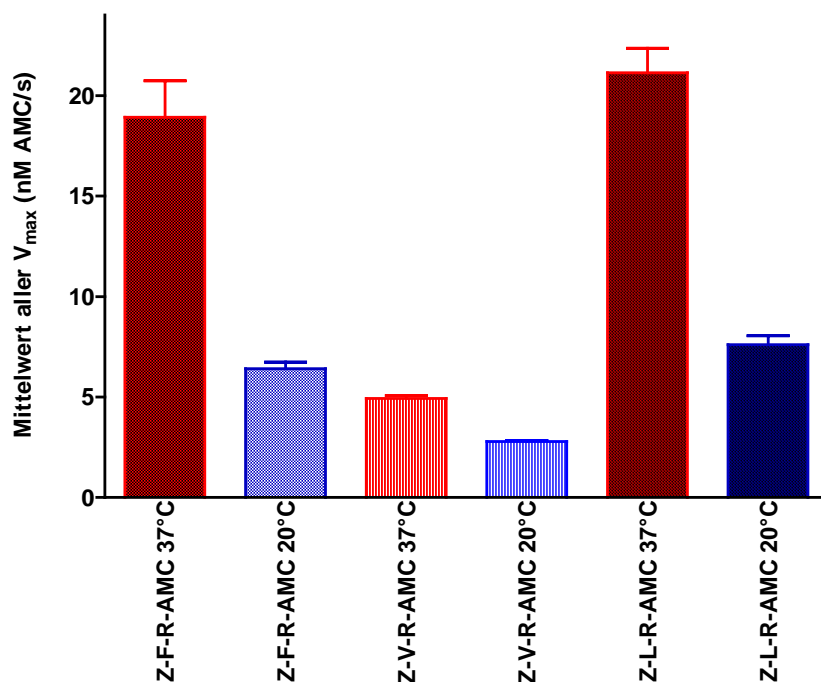


Abbildung 17: Einfluss der DMSO Konzentration auf V_{\max} der Reaktion von Cathepsin K mit seinen Substraten. Alle nach Gleichung 5 errechneten V_{\max} -Werte aus den Abbildungen 10 bis 12 wurden auf eine einheitliche Enzymkonzentration von 0,25 nM normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen bei verschiedenen DMSO-Konzentration unter den jeweils unter den Balken angegebenen Bedingungen.

Da die beschriebenen Versuche zum Umsatz fluorogener Peptidsubstrate zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit verschiedenen Cathepsin K- Verdünnungen durchgeführt wurden und zur Berechnung der katalytischen Konstante die Kenntnis der jeweils verwendeten Enzymkonzentration nötig ist, wurde an jedem Versuchstag eine E64- Titration der verwendeten Enzymverdünnung durchgeführt (siehe Methodenteil). Unter Verwendung des Wertes für die Enzymkonzentrationsaktivität konnten k_{cat} und k_{cat} / K_M berechnet werden. Sie sind zusammen mit K_M und K_i in Tabelle 1 zusammengestellt.

Die ausführliche Diskussion dieser unerwarteten, aber wichtigen Ergebnisse erfolgt später, hier sollen erst einmal die für die weitere experimentelle Arbeit mit Cathepsin K abzuleitenden Konsequenzen zusammengefasst werden:

- 1.) Die Stabilität des Enzyms ist zwischen pH 5 und 6 am besten. Dieser Bereich entspricht auch dem Aktivitätsoptimum (pH- Optimum). Zur Pufferung in diesem pH- Bereich eignet sich Zitratpuffer mit Zusatz von 5 mM DTT oder Cystein sehr gut.
- 2.) Um die Löslichkeit der fluorogenen Peptidsubstrate sicherzustellen, ist ein Zusatz von DMSO zum Test unerlässlich. Die Konzentration sollte aber wegen des nachteiligen Effekts auf die Substratbindung bei maximal 1 % liegen.
- 3.) Die Verwendung von Z-Phe-Arg-AMC ist nicht zu empfehlen. Z-Leu-Arg-AMC ist nur geringfügig teurer, aber in allen untersuchten Parametern (k_{cat} , K_M , k_{cat} / K_M) deutlich überlegen und somit die beste Alternative.

4.3. Nachweis von renaturiertem Cathepsin K im Komplex mit dem inhibierenden Propeptid ohne separaten Trennschritt

Wie schon mehrfach erwähnt, ist das Propeptid ein kompetitiver Inhibitor seines Mutterenzyms. Das bedeutet Reversibilität der Hemmung. Deshalb ist die Messung des Umsatzes von guten Substraten prinzipiell auch in Anwesenheit eines solchen Inhibitors möglich. Um die Nachweisgrenze zu steigern, sollten dazu allerdings Bedingungen gewählt werden, unter denen die normalerweise hochaffine Bindung des Propeptids deutlich vermindert ist. Bei vielen lysosomalen Proteasen ist die Propeptidbindung an das Mutterenzym stark pH-abhängig (Volkel, Kurz et al. 1996; Maubach, Schilling et al. 1997; Visal, Taylor et al. 1998; Billington, Mason et al. 2000; Guay, Falgout et al. 2000). Die stärkste pH- Abhängigkeit wurde bisher beim Cathepsin S gefunden, bei pH-Werten unter 4,7 war keine Hemmung des Mutterenzyms mehr feststellbar (Maubach, Schilling et al. 1997).

4.3.1. pH- Abhängigkeit der Inhibition des Cathepsin K durch sein Propeptid

Nach Literaturdaten war auch für Cathepsin K eine starke pH- Abhängigkeit der Inhibition durch sein Propeptid zu erwarten. Billington und Mitarbeiter beschrieben einen Anstieg des K_i von 2,61 nM auf 147 nM durch die Absenkung des pH von 6,0 auf 4,0 (Billington, Mason et al. 2000). So war es nahe liegend, die kinetischen Konstanten für die Reaktion zwischen Enzym und Propeptid unter unseren Versuchsbedingungen bei verschiedenen pH- Werten zu überprüfen. Die Ergebnisse sollten dann bei der Auswertung der geplanten Aktivitätsmessungen des durch Propeptidzusatz renaturierten Cathepsin K verwendet werden. Es wurde die Propeptidhemmung von Cathepsin K bei drei pH- Werten im Bereich zwischen 4 und 8 verglichen. Mit 4, 6 und 8 wurden die pH- Werte so gewählt, dass Vergleichbarkeit mit Literaturdaten (pH 4,0 und 6,0), vor allem aber die Nutzung der Ergebnisse für die geplanten Renaturierungsexperimente möglich war. Aus Abbildung 18 ist zu entnehmen, dass bei allen drei pH- Werten der langsame feste Bindungstyp vorliegt, d.h. bereits mit sehr geringen Propeptidkonzentrationen (< 100 nM) wird nach wenigen Minuten eine fast vollständige Hemmung erreicht. Aus solchen Kurven lassen sich durch nichtlineare Optimierungsverfahren nicht nur die K_i - Werte, sondern auch die Bildungs- (k_{on}) und Zerfallskonstanten (k_{off}) des Enzym- Propeptid- Komplexes ermitteln. Dazu gibt es verschiedene Möglichkeiten. Wir beschrieben die Primärdaten durch drei Differenzialgleichungen (siehe Gleichungen 11 bis 13 im Methodenteil, Abschnitt 2.2.2.2.). Das ist wesentlich aufwendiger als das Standardverfahren, das mit Gleichung 3 bestimmte Sekundärdaten nutzt und von einer konstanten Produktbildungsrate der Kontrollmessungen ausgeht. Die Verwendung von

Differenzialgleichungen ermöglichte aber die Berücksichtigung des zeitabhängigen Aktivitätsverlustes des Enzyms, der bei pH 4,0 und 8,0 keinesfalls zu vernachlässigen ist. Durch nichtlineare Parameteroptimierung nach numerischer Integration wurden die in Tabelle 2 zusammengestellten Konstanten und ihre Unsicherheit bestimmt, lediglich der K_i -Wert ($k_{\text{off}} / k_{\text{on}}$) wurde manuell berechnet, sein Fehler ergab sich aus dem Fehlerfortpflanzungsgesetz.

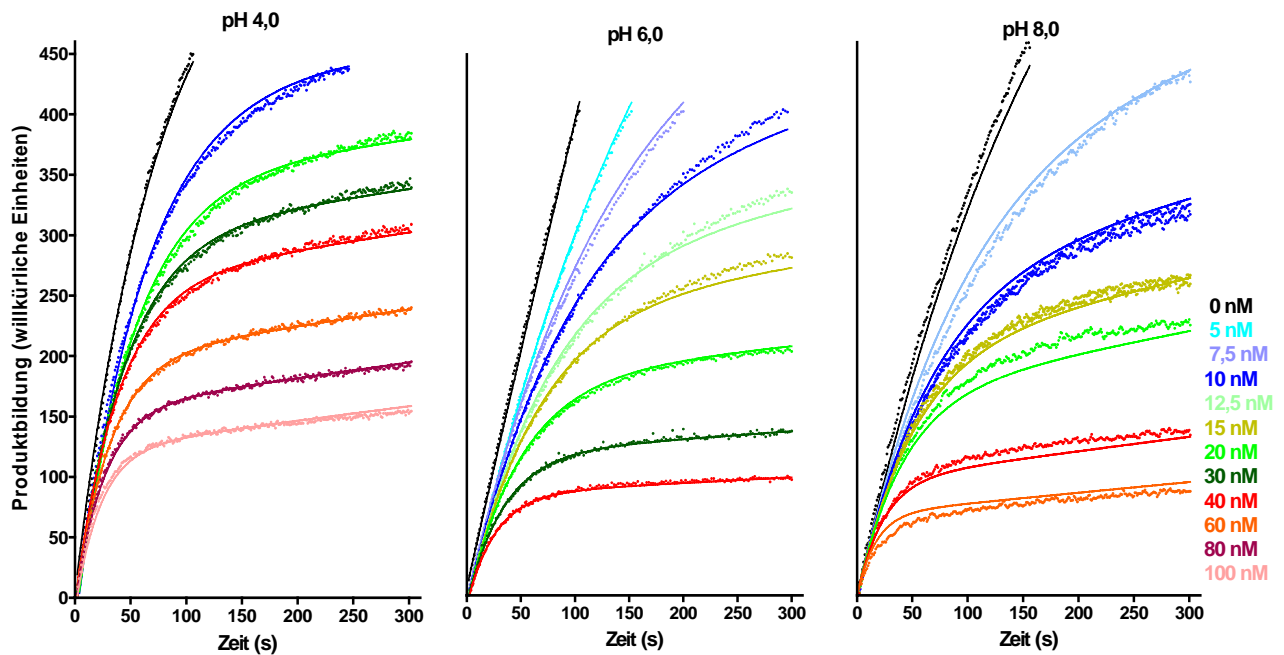


Abbildung 18: pH- Abhängigkeit der Inhibition von Cathepsin K durch sein Propeptid:

Die Messungen erfolgten mit dem LS 50 B Luminescence Spektrometer bei 37 °C in Standardtestpuffer mit 1,66 μM Z-Leu-Arg-AMC und 1 % DMSO (pH 4 und 6) bzw. in 100 mM TRIS pH 8 mit 2,5 μM Z-Leu-Arg-AMC und 0,025 % DMSO. Die in den Legenden angegebene Propeptidkonzentration wurde durch Zusatz von maximal 1 % (bezogen auf 2 ml Testvolumen) Propeptidstammlösung realisiert, deren Konzentration durch Messung der Absorbanz bei 280 nm bestimmt worden war. Reaktionsstart und Start der Aufzeichnung der Produktbildungs- Zeit- Kurven erfolgten zeitgleich bei Zugabe von 0,186 nM Cathepsin K bei pH 4,0, 0,11 nM Cathepsin K bei pH 6,0 und 0,15 nM Cathepsin K bei pH 8,0. Die Berechnung des K_i erfolgte aus insgesamt 11 (pH 4 und 8) bzw. 13 (pH 6) Messreihen.

Tabelle 2: Kinetische Konstanten für die Inhibition von Cathepsin K durch sein Propeptid

pH	4.0	6.0	8,0
$k_{\text{off}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$9,62 \cdot 10^{-4} \pm 0,92 \cdot 10^{-4}$	$4,6 \cdot 10^{-4} \pm 0,42 \cdot 10^{-4}$	$14,4 \cdot 10^{-4} \pm 0,2 \cdot 10^{-4}$
$k_{\text{on}} \text{ (nM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}\text{)}$	$4,57 \cdot 10^{-4} \pm 0,11 \cdot 10^{-4}$	$17,1 \cdot 10^{-4} \pm 0,15 \cdot 10^{-4}$	$9,4 \cdot 10^{-4} \pm 0,03 \cdot 10^{-4}$
$K_i \text{ (nM)}$	$2,1 \pm 0,29$	$0,27 \pm 0,025$	$1,53 \pm 0,022$
$k_{\text{Inaktivierung}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$197 \cdot 10^{-4} \pm 4 \cdot 10^{-4}$	$8,1 \cdot 10^{-4} \pm 2,8 \cdot 10^{-4}$	$54 \cdot 10^{-4} \pm 0,2 \cdot 10^{-4}$

Die Ergebnisse weichen erheblich von denen in der oben zitierten Publikation ab. Deshalb sollen hier noch Experimente angeführt werden, die unsere Daten stützen und mögliche Erklärungen für die Differenzen liefern:

Analog zu den in Abbildung 18 dargestellten Inhibitionsstudien mit dem optimalen Substrat Z-Leu-Arg-AMC wurden schon wesentlich früher mit Z-Phe-Arg-AMC Messreihen durchgeführt, die bezüglich der Größenordnung der Inhibitionskonstante (K_i' bei pH 6,0 =: 0.1445 nM, bei pH 4,0 = 0,6 nM) ähnliche Ergebnisse wie die Versuche mit dem Substrat Z-Leu-Arg-AMC erbrachten, deren weitere Auswertung aber wegen der Unsicherheiten der K_M -Bestimmung für Z-Phe-Arg-AMC nicht mehr sinnvoll erschien. Deshalb sind nur die K_i' -Werte angegeben. Beispielhaft zeigt Abbildung 19 einen dieser Versuche bei pH 4,0. Es wurde sowohl Assoziation (A) als auch Dissoziation (B) des Enzym- Propeptid- Komplexes bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen beobachtet. In Experiment A traf das Enzym zu Beginn der Messung gleichzeitig auf Substrat und Inhibitor. Man erkennt, dass Propeptidkonzentrationen von 20 und 40 nM bei allen drei Substratkonzentrationen zu einer deutlichen Hemmung des Enzyms führen. In Experiment B wurde das Enzym mit einem Überschuss an Propeptid bei pH 6 vorinkubiert und die Zeitabhängigkeit der Produktbildung nach starker Verdünnung in ein Substrat- haltiges Medium mit pH 4,0 gemessen. Die gut zu beobachtende initiale Steigerung der Produktbildungsrate belegt, dass die Interaktion zwischen Cathepsin K und seinem Propeptid reversibel ist. Das entspricht den bereits vorn erwähnten Erwartungen bei einem kompetitiven Inhibitor. Das Substrat verdrängt zunehmend mehr Inhibitor vom Enzym bis sich nach ein bis zwei Minuten ein neuer Gleichgewichtszustand einstellt. Auch hier ist die Abhängigkeit der steady- state Geschwindigkeiten der Produktbildung von der sehr geringen Propeptidkonzentration (1 bis 5 nM) noch sehr deutlich. Das alles spricht klar gegen den vorn zitierten K_i von 147 nM bei pH 4,0.

Für die Richtigkeit der Ergebnisse spricht auch, dass die in den Abbildungen 18 und 19 dargestellten Versuchsreihen im Abstand von zwei Jahren mit zwei völlig unabhängig voneinander hergestellten Cathepsin K- Propeptid- Chargen (Schlabrakowski 2003) durchgeführt wurden. Die Konzentration beider Cathepsin K- Propeptid- Chargen wurde spektrophotometrisch bestimmt und zusätzlich mittels Sekundärtitration gegen vorher gegen E 64 titriertes Cathepsin K überprüft. Die zur Herstellung der Propeptidstammlösung verwendeten Lösungsmittel (Azetonitril, Guanidinhydrochlorid) haben in den eingesetzten Verdünnungen nur einen geringfügig hemmenden Effekt auf die Enzymaktivität.

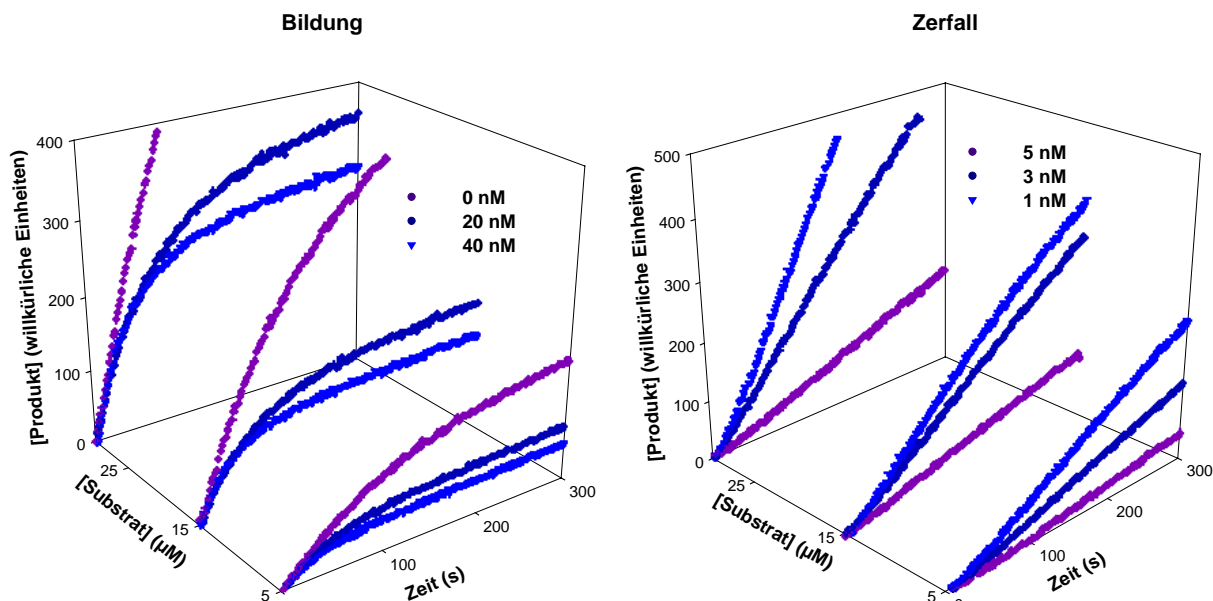


Abbildung 19: Inhibition von Cathepsin K durch sein Propeptid bei pH 4.0. Die Messungen wurden im Standardtestpuffer pH 4,0 mit nur 1 mM DTT. Als Substrat wurde Z-Phe-Arg-AMC in der jeweils angegebenen Konzentration verwendet, aus der Substratzugabe ergaben sich DMSO- Konzentrationen von 0,05 –1,5 %. Die Messung fand bei 37 °C mit dem LS 50 B Luminescence Spectrometer statt.

Abbildungsteil A: Die Bildung des Enzym- Propeptid- Komplexes wurde untersucht, indem die Registrierung der Produktbildung zeitgleich mit der Zugabe von Cathepsin K (0,15 nM) in eine Küvette begann, in der sich Testmedium mit Substrat und Propeptid befand.

Abbildungsteil B: Um den Komplexzerfall zu messen, wurde in einem Vorversuch die benötigte Enzym- Propeptid- Komplex- Stammlösung durch 15 min Inkubation der Reaktanten bei Raumtemperatur und pH 6,0 außerhalb der Küvette hergestellt. Die starke Verdünnung nach Zusatz eines Aliquots dieser Stammlösung in die Küvette führte zu folgenden Endkonzentrationen im Test: Cathepsin K 0,25 nM / Propeptid 1 nM; 0,76 nM / 3 nM und 1,268 nM / 5 nM. Zeitgleich mit der Verdünnung begann die Registrierung der Produktbildung.

Eine mögliche Erklärung für die um etwa eine Größenordnung bessere Hemmwirkung der verwendeten Propeptidpräparationen liefert die nachfolgend beschriebene Beobachtung: Im Rahmen der Untersuchungen zur Hemmung des Cathepsin K durch sein Propeptid wurde auch versucht, durch Titrationsversuche in Mikrotiterplatten die Stöchiometrie dieser Reaktion zu untersuchen. Dabei fiel auf, dass es im Vergleich zu den in Glasgefäßen hantierten Makrotests zu einem erheblichen Verlust an „wirksamen“ Propeptid kam. Deshalb lag es nahe, an eine unspezifische Bindung des Propeptids an Kunststoffoberflächen (Mikrotiterplatten, Spitzen, Testgefäße) zu denken, wie das für andere Proteine bereits bekannt ist (Rudolph, Böhm et al. 1997).

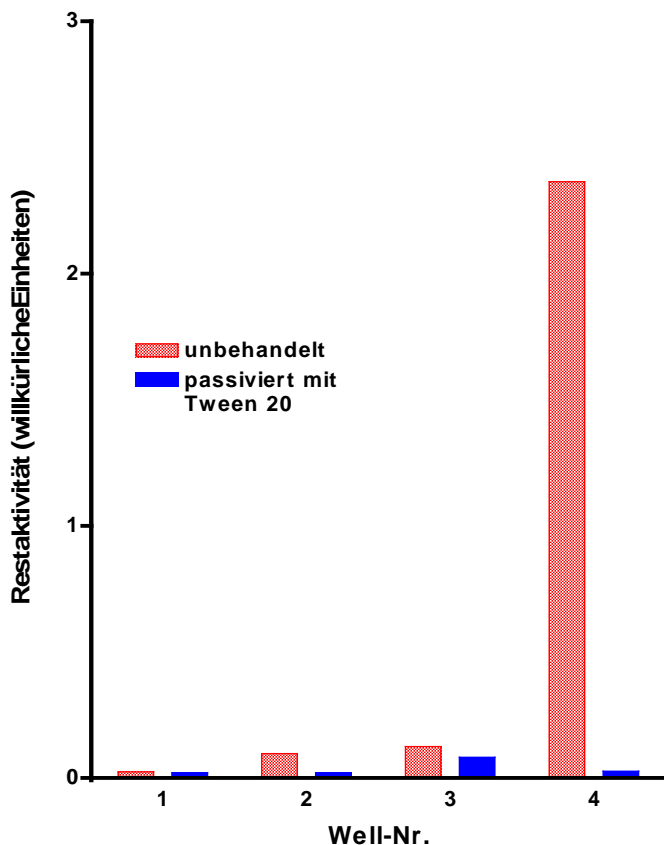
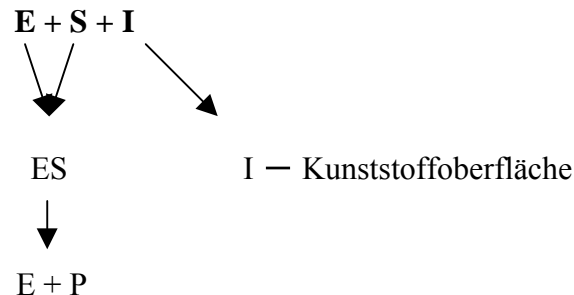


Abbildung 20: Nachweis der Bindung von Cathepsin K- Propeptid an Kunststoff.

Eine eindeutig hemmende Propeptidlösung wurde von einem Well der Mikrotiterplatte zum nächsten transferiert, insgesamt viermal. Zwischen jedem Transfer wurde eine Minute geschüttelt, so dass die Wände gut benetzt waren. In jedem Well wurden gleiche Volumina der Propeptidlösung zurückgelassen. Nach dem Transfer erfolgte die Zugabe von Standardtestpuffer pH 5,0 mit 10 μ M Z-Phe-Arg-AMC. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von 0,85 nM Cathepsin K. Im Test befanden sich 78 nM Propeptid. Messung mit Spectra Max Gemini bei Raumtemperatur. Verglichen werden unbehandelte Oberflächen mit „passivierten“. Die „Passivierung“ erfolgte, wie im folgenden Text beschrieben, durch Tween 20 Behandlung.

Zum Nachweis einer solchen Bindung des Propeptids wurde folgendes Experiment durchgeführt: Eine Propeptidlösung wurde in einer Mikrotiterplatte mehrfach von einem Well ins andere transferiert, anschließend wurde die verbliebene Hemmwirkung gegenüber Cathepsin K mit der der Ausgangslösung verglichen. So konnte indirekt auf die noch „wirksame“ Propeptidkonzentration geschlossen werden. Wie Abbildung 20 zeigt, ist im ersten Well vor dem Transfer das Enzym noch vollständig gehemmt, zu leichten Anstiegen kommt es bereits nach der ersten und zweiten Übertragung (Well 2 und 3), nach der dritten kommt es dann zu einem sprunghaften Anstieg der Cathepsin K- Aktivität (Well 4). Das belegt, dass die Konzentration an Propeptid auf einen kaum noch hemmenden Wert abgefallen war. Die Bindung des Propeptids an die Wand von Kunststoff ist also beträchtlich. Bei ähnlichen Problemen mit dem Propeptid von Cathepsin S in unserem Labor wurden alle Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, etc. zur Absättigung der Bindungsstellen vor der Benutzung mindestens 2 Stunden lang in eine Detergenz- Lösung (5 % Tween 20) eingelegt, anschließend gründlich gespült und getrocknet (Pietschmann 2002). Abbildung 20 zeigt auch, dass diese Form der Passivierung der Kunststoffoberflächen auch die Bindung von Cathepsin K- Propeptid verringert.

Eine Nutzung der Propeptidbindung an Kunststoffoberflächen zur Verlagerung des Gleichgewichts nach folgendem Schema wurde bedacht. Da sich aber auch der EI- Komplex bindet, ist die Reproduzierbarkeit schlecht und die Idee wurde wieder verworfen.



Schema 2: Konkurrenz zwischen Enzym und Kunststoffoberflächen um die Bindung des Propeptids. (E: Enzym; S: Substrat; I: Inhibitor; ES: Enzym- Substrat- Komplex; P: Produkt)

In analogen Versuchen wurde auch eine beträchtliche Bindung des Substrates Z-Phe-Arg-AMC an Kunststoffoberflächen, nicht aber an Glas, nachgewiesen. Dieser Effekt konnte jedoch mit keinem der von uns getesteten Passivierungssubstanzen (Tween 20, Polyvinylpyrrolidon 360, Triton X100) und auch nicht durch die drei Bausteine des Substrates (Phenylalanin, Arginin und AMC) wirksam reduziert werden.

Aus diesen Ergebnissen wurden bezüglich des experimentellen Ablaufs zur Bestimmung von K_M und K_i folgende Schlussfolgerungen gezogen: Es wurden grundsätzlich nur Glasgefäße verwendet, die Pipettenspitzen wurden mehrfach mit der zu hantierenden Lösung (Substrat- bzw.- Propeptidlösung) vorgespült. Bei Messungen in Mikrotiterplatten wurde davon ausgegangen, dass die Bindung des Substrates an die Kunststoffoberflächen die tatsächliche Substratkonzentration einheitlich unter den nominellen Wert vermindert und so zumindest die Vergleichbarkeit innerhalb der Messreihe gewährleistet bleibt. Alle Versuche zur Bestimmung enzymkinetischer Parameter (K_M , K_i) wurden grundsätzlich in speziell temperierten Glasküvetten durchgeführt.

Die Inhibitionsversuche mit Cathepsin K und seinem Propeptid zeigten, dass eine einfache Übernahme des beim Cathepsin S bewährten Verfahrens der pH- Wert- Senkung zur deutlichen Verminderung der inhibitorischen Wirksamkeit des Propeptids nicht möglich ist. Eine Senkung des pH- Wertes $< 4,0$, die sehr wahrscheinlich den Zerfall des Enzym-Propeptid- Komplexes beschleunigt hätte, wurde nicht versucht, da die in Abbildung 7 zusammengefassten Vorversuche für diesen pH- Bereich schon einen erheblichen Abfall der Stabilität und der Aktivität von Cathepsin K gezeigt hatten. Statt dessen wurde noch versucht,

den Einfluss der Temperatur auf die Interaktion zwischen Enzym, Inhibitor und Substrat zur Steigerung der Empfindlichkeit des Verfahrens zu nutzen.

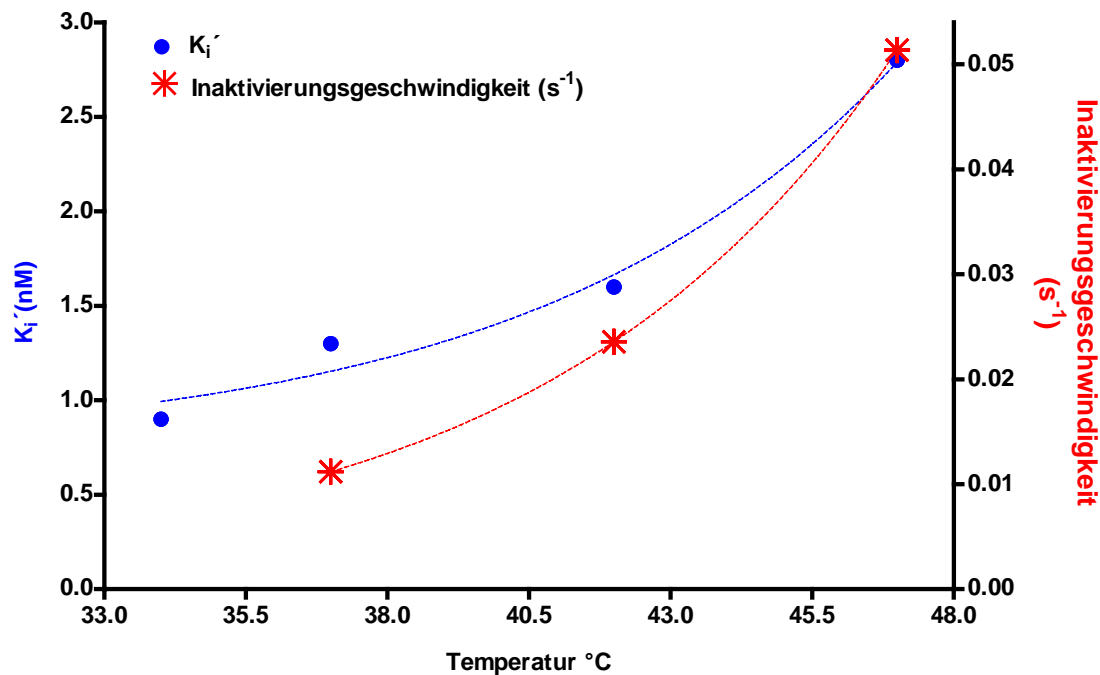


Abbildung 21: Temperaturabhängigkeit der Cathepsin K- Inhibition durch sein Propeptid: Die Messungen erfolgten in MTP in gering modifiziertem Standardtestmedium pH 4,0 mit 1 mM DTT , 3 % DMSO und 40 μ M Z-Phe-Arg-AMC am temperierbaren Reader Spectra Max Gemini.

Linke Ordinate: Vorinkubation von Cathepsin K mit dem Propeptid, Verdünnung des Enzym- Inhibitor- Komplexes im Test, die Cathepsin K Konzentration betrug 1,2 nM. Aufzeichnung der Produktbildungs- Zeit- Kurven während des Zerfalls des EI-Komplexes. Aus dem Anstieg der Produktbildungsrate wurde K_i' berechnet. Wegen der Unsicherheit der K_M Bestimmung für Z-Phe-Arg-AMC wurde kein K_i bestimmt.
Rechte Ordinate: Reaktionsstart durch Zugabe von 0,25 nM Cathepsin K. Aus den Produktbildungs- Zeit- Kurven wurde durch nichtlineare Optimierung mit Gleichung 2 die Inaktivierungsgeschwindigkeit berechnet.

Abbildung 21 zeigt, dass es mit einer Erhöhung der Temperatur sowohl zu einem Anstieg des K_i' (linke Ordinate) als auch der Inaktivierungsgeschwindigkeit (rechte Ordinate) kommt. Mit steigender Temperatur verliert nicht nur das Propeptid sehr schnell seine strukturelle Integrität und damit seine Funktionsfähigkeit, sondern auch das Enzym selbst. Beide Prozesse weisen etwa die gleiche Temperaturabhängigkeit auf und kompensieren sich so gegenseitig. Deshalb bringt diese Methode bei der Steigerung der Nachweisgrenze von renaturiertem Cathepsin K in Gegenwart des Propeptids keine Vorteile.

Damit war das Spektrum der im Rahmen der Aufgabenstellung sinnvollen Möglichkeiten zur Verringerung der Affinität zwischen Cathepsin K und seinem Propeptid erschöpft. Eine

Erhöhung der Produktbildungsrate bei gegebener Propeptid- Konzentration war damit nur noch durch Verwendung von Substraten im Konzentrationsbereich $\gg K_M$ möglich. Das ließ sich mit den AMC- Substraten wegen der ausführlich untersuchten Hemmwirkung nicht realisieren. Das veranlasste uns zur Suche nach alternativen Substraten, die vielleicht mit höherer Affinität an das Enzym binden und so besser mit dem Propeptid konkurrieren könnten. Naheliegend war die Untersuchung von nativen und denaturierten Proteinen.

4.3.2. Testung von Protein- Substraten zur Cathepsin K- Aktivitätsbestimmung

4.3.2.1. Azocasein

Durch kovalente Bindung von farbigen Gruppen an das Milchprotein Casein erhält man Azocasein. Die Spaltung des Substrates wird mittels spektrophotometrischer Messung der gefärbten Peptide im Überstand nach Säurefällung nachgewiesen, durch die das nicht umgesetzte Substrat präzipitiert wird. Die einfache Auswertung ist der Vorteil von Azocasein gegenüber ungefärbten, natürlichen Substratproteinen. Um das Verfahren im Rahmen unserer Zielstellung nutzen zu können, muss es aber auch hinreichend empfindlich sein. Das wurde in einem Vorversuch geprüft. Da denaturierte Proteine oft besser abgebaut werden, wurde ein Teil der 2 %igen Azocaseinlösung in 6 M Gua und 10 mM DTT ca. 45 Minuten bei 45 °C denaturiert. Beide Testreihen wurden mit Cathepsin K in Konzentrationen von 0,03 nM bis 31 nM bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Nach Reaktionsstopp, Abkühlen und Zentrifugation wurde die Absorbanz bei 360 nm bestimmt und in Abbildung 22 in Abhängigkeit von der Cathepsin K- Konzentration dargestellt. Man erkennt, dass erst ab einer Konzentration von 1 nM Cathepsin K im Test die Spaltung des Azocasein nachweisbar ist. Mit fluorogenen Substraten hingegen kann man bei empfindlichen Messeinstellungen schon Cathepsin K- Konzentrationen im unteren pikomolaren Bereich nachweisen. Damit ist die Azocasein- methode für die Zielstellung zu unempfindlich.

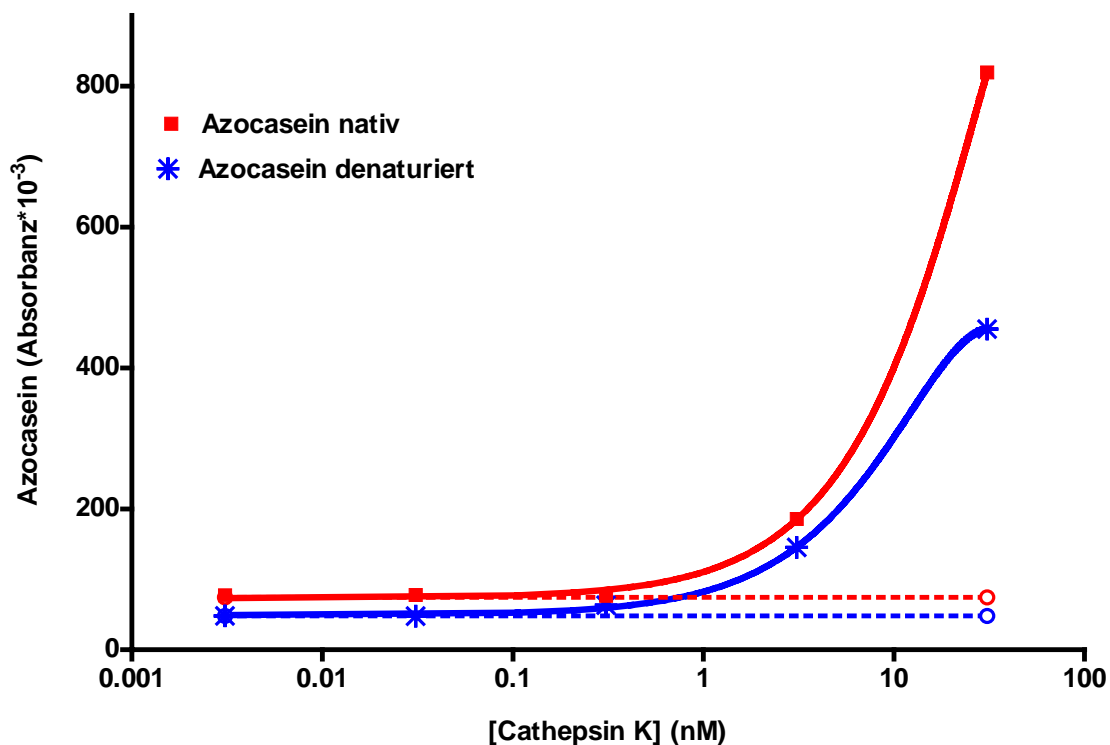


Abbildung 22: Bestimmung der Nachweisgrenze für die Messung der Cathepsin K- Aktivität mit der Azocaseinmethode. Der Versuchsablauf ist ausführlich im Methodenteil, Abschnitt 2.2.7 erläutert. Die Blindwerte, in der Grafik gestrichelt dargestellt, wurden bestimmt, indem Reaktionsgemisch sofort nach Zugabe des Enzyms gestoppt wurde. Die vollen Kurven entsprechen den Messwerten nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C.

Rote Kurven: Einsatz einer nativen 2 %igen Azocaseinlösung.

Blaue Kurven: Einsatz von denaturiertem Azocasein. Das Azocasein wurde wie im Text beschrieben denaturiert, anschließend wurde es zur Reinigung über eine Gelsäule (NAP-5 Säule) gegeben (0,5 ml der Azocaseinlösung wurden aufgetragen, das Protein wurde schließlich mit 1 ml Wasser unter Sichtkontrolle eluiert (ca. 780 µl)). Durch dieses Reinigungsverfahren wurde die Konzentration der für den Test verwendeten Azocaseinlösung etwas unter 2 % verringert.

4.3.2.2. Natürliche Protein- Substrate

Erweitert man das Spektrum der möglichen Substrate für Cathepsin K auf alle natürlichen Proteine, muss der Test in zweifacher Hinsicht optimiert werden, einmal hinsichtlich des Proteins und zum zweiten bezüglich des Nachweisverfahrens für die Spaltprodukte. Wir begannen mit der Suche nach geeigneten Substratproteinen.

Hierzu wurden die zu testenden Proteine als konkurrierende Substrate in den fluorometrischen Test eingesetzt: je besser ein Substratprotein vom Cathepsin K gebunden wird, desto größer die inhibierende Wirkung auf den Umsatz der fluorogenen Substrate. Da Albumin und Lysozym als preisgünstige Proteine in ausreichender Menge zur Verfügung

standen, wurden diese zunächst getestet. Beide zeigten in Konzentrationen von 100 μM eine hemmende Wirkung auf den Umsatz von Z-Leu-Arg-AMC, werden also von Cathepsin K abgebaut. Diese Hemmung ist beim Einsatz von chemisch denaturiertem Albumin am ausgeprägtesten.

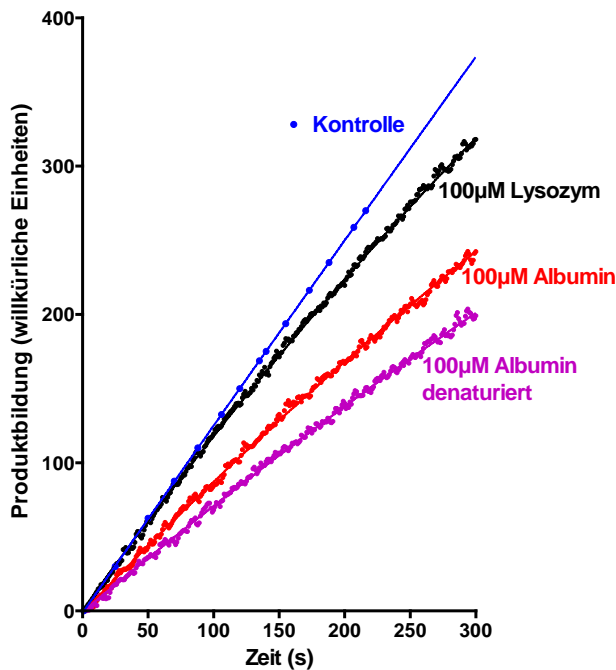


Abbildung 23: Vergleich der Affinität natürlicher Proteine zum Cathepsin K durch Zusatz als konkurrierendes Substrat in den fluorometrischen Test:

Die Messungen erfolgten in Glasküvetten mit dem LS 50 B Luminescence Spectrometer im Standardtest (100 mM Na₂Zi pH 5,0 / 100 mM NaCl / 1mM EDTA / 0,01 % Chaps und 5 mM DTT) mit 18 μM Z-Leu-Arg-AMC bei 37 °C. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von 12,3 pM Cathepsin K. Zur Denaturierung wurde ein Aliquot der Albuminstammlösung mit 10 mM DTT versetzt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

Da aber die zur effektiven Konkurrenz mit dem fluorogenen Substrat notwendige Konzentration auch bei denaturiertem Albumin noch relativ hoch war, erinnerten wir uns an „Prionex[®]“, ein Kollagenhydrolysat aus Schweinehaut. Es wird vermutlich im großen Maßstab für kosmetische Zwecke hergestellt und verschiedentlich mit Erfolg anstelle von Albumin zur Stabilisierung biochemischer Präparate eingesetzt (Gaffney, Edgell et al. 1996). Mit diesem Protein hatten wir schon versucht, die unspezifische Bindung von Cathepsin K und seinem Propeptid an Oberflächen zu reduzieren und die Stabilität des gelösten Enzyms zu verbessern. Damals war der starke Hemmeffekt auf den Umsatz des fluorogenen Substrats ein Nebeneffekt, der den geplanten Einsatz unmöglich machte. Jetzt zeigte ein Vergleich mit den globulären Proteinen Albumin und Lysozym aber rasch die Überlegenheit der fragmentierten Kollagenfibrillen. Wie aus Abbildung 24 zu erkennen ist, hat Prionex[®] einen starken Hemmeffekt auf den Umsatz von Z-Leu-Arg-AMC.

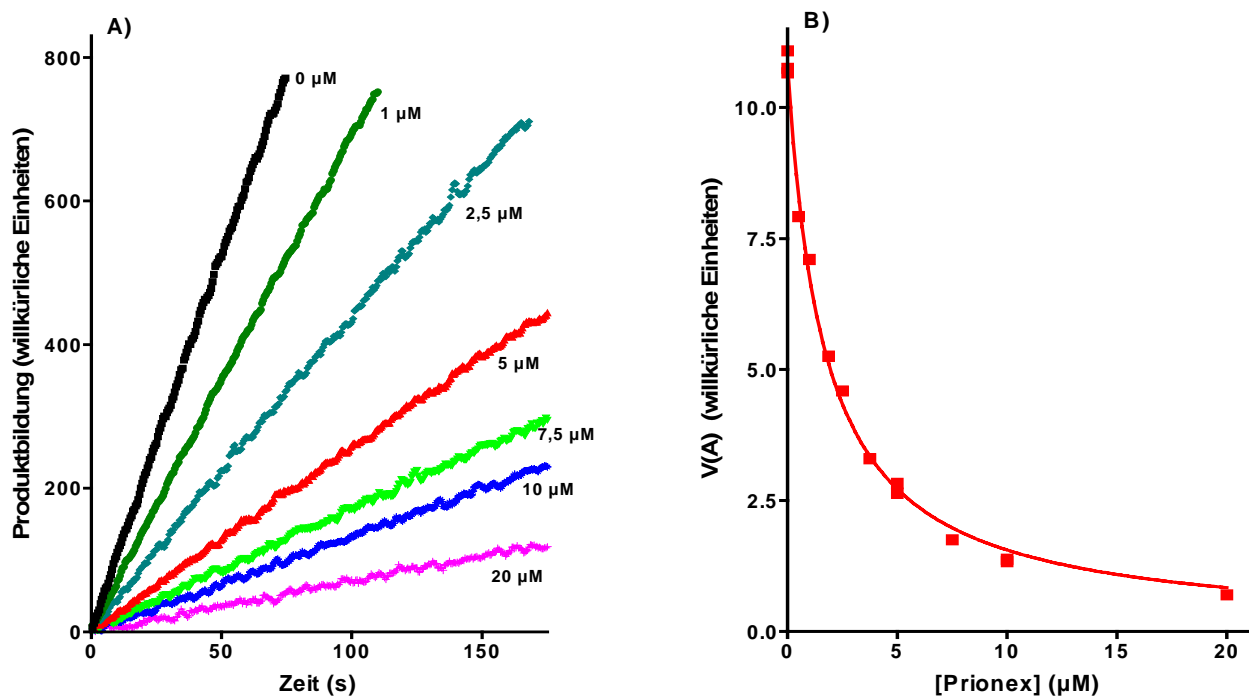


Abb. 24: Einfluss von Prionex® auf die Produktbildung im fluorometrischen Standardtest: Die Enzymaktivitätsmessungen fanden in Glasküvetten in Standardtestpuffer bei pH 5,0 und 37°C statt. DMSO- Konzentration 0,5 %; Substratkonzentration: Z-Leu-Arg-AMC 2,5 μM ; Prionex wurde von 0 bis 20 μM variiert. Cathepsin K- Konzentration 12,3 pM. Durch nichtlineare Optimierung der Produktbildungs- Zeit- Kurven (A) erfolgte die Berechnung von V(A) und Darstellung dieser als Funktion der Prionexkonzentration (B), die eingezeichnete Kurve resultiert aus der Optimierung der Parameter mit der Modellgleichung für die kompetitive Inhibition ($K_i = 1,05 \mu\text{M}$).

Eine Prionex®- Konzentration von 20 μM vermindert die Produktbildung aus Z-Leu-Arg-AMC auf 6,44 % der Kontrollmessung, halbmaximale Hemmung beobachtet man bei 1,05 μM . Cathepsin K ist die einzige Cysteinprotease, die *in- vivo* tripelhelikales Kollagen spalten kann (Garnero, Borel et al. 1998; Kafienah, Brömme et al. 1998; Atley, Mort et al. 2000), somit kommt Prionex® dem natürlichen Substrat des Cathepsin K sehr nahe. Außerdem führt Prionex® zu einer Stabilisierung des Enzyms. Mit der Erhöhung der Prionex®- Konzentration kam es zu einem Sinken der Inaktivierungsgeschwindigkeit von $3,8 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ auf $< 5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Dieses Experiment ist erst einmal ein indirekter Beweis, dass Prionex®, vermutlich wegen der Verwandtschaft mit dem natürlichen Substrat des Cathepsin K, eine deutlich höhere Affinität zum Enzym besitzt als Albumin, Lysozym und die fluorogenen Substrate. Das sah ganz erfolgversprechend aus, so dass nun geprüft werden musste, ob und mit welcher Geschwindigkeit Prionex® durch Cathepsin K abgebaut wird. Zum qualitativen Nachweis diente die SDS- Gelelektrophorese und zum quantitativen die Bestimmung der freien Aminogruppen.

SDS- Gelelektrophorese:

In insgesamt 32 Ansätzen, die sich in der Cathepsin K- Konzentration (3 nM bis 31 nM) und in der Inkubationszeit (0 bis 3 Stunden) unterschieden, sollte das im Prionex[®] enthaltene Peptidspektrum und dessen mögliche Veränderung durch den Proteasezusatz untersucht werden. Abbildung 25 zeigt einem repräsentativen Ausschnitt.

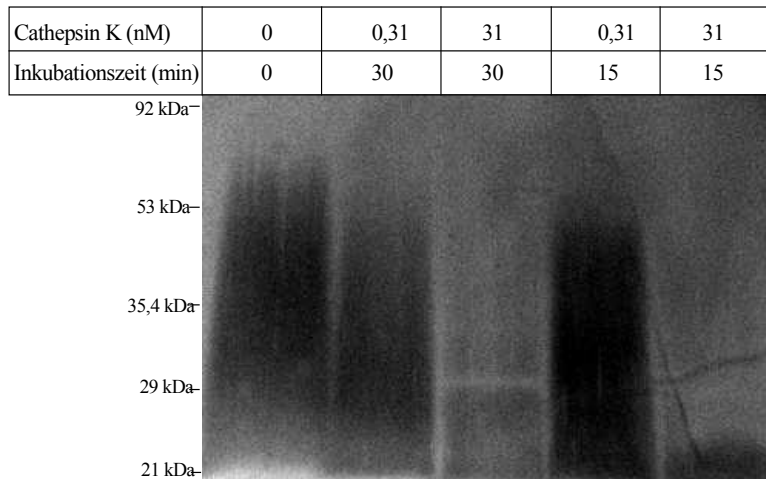


Abbildung 25: SDS- Page des Prionex: Nachweis der Prionex[®]- Verdauung:

Inkubation von Cathepsin K unterschiedlicher Konzentration mit Prionex bei 37 °C über verschiedene Zeiträume. Dann Versetzen der Proben mit Probenpuffer und 10 Minuten Kochen bei 100 °C. Sammelgel 4,5 %, Trenngel 10 %. Ablauf der Elektrophorese und der Silberfärbung siehe Materialien und Methoden, Abschnitt 2.2.4. und 2.2.5.. Marker: Bio Rad.

Bahn 1 zeigt, dass Prionex[®] aus einem Gemisch ganz unterschiedlicher Kollagenspaltstücke besteht. Die deutlich geringere Schwärzung des Gels im Bereich der Bahnen 3 und 5, auf die Proben mit 31 nM Cathepsin K aufgetragen wurden, lässt sich durch den Abbau des Prionex[®] durch Cathepsin K erklären. Die so entstandenen kleineren Spaltstücke wanderten aufgrund ihres Molekulargewichts aus dem Gel heraus. Längere Inkubation von Prionex[®] mit geringeren Cathepsin K- Konzentrationen führte zu keinem stärkeren Abbau des Substrates, vermutlich verursacht die Inkubationstemperatur von 37 °C in diesem Zeitraum eine Inaktivierung des Enzyms (Ergebnisse nicht gezeigt).

Zur Quantifizierung der Spaltungsrate kann man prinzipiell auch die Farbintensität einer Bande in der Elektrophorese im Vergleich zu definierten Kontrollwerten messen. Mit einem solchen Auswerteverfahren wären im vorliegenden Fall jedoch keine zuverlässigen Ergebnisse zu erwarten gewesen, da keine Spaltprodukte, sondern nur das Verschwinden des Substratproteins beobachtet werden konnte.

Es erschien wesentlich einfacher und genauer, die mit der Spaltung der Substratproteine zur Peptiden zwangsläufig verbundene Erhöhung der Konzentration an freien Aminogruppen zu messen, wie das auch in einschlägigen Handbüchern empfohlen wird (Wiederanders, Kirschke et al. 1986). Von den Verfahren zum Nachweis freier Aminosäuren wurden erst einmal die Empfindlichkeit des einfachsten getestet: der Aminogruppenachweis mit Ninhydrin nach YEMM und COCKING.

Aminogruppenbestimmung nach YEMM und COCKING:

Ninhydrin reagiert mit α - Aminosäuren zu einem Aminoketon, welches in einer zweiten Reaktion mit einem weiteren Ninhydrin- Molekül einen rotbraunen Farbstoff bildet. Die Farbintensität nach Ablauf der Reaktion ist proportional zur Aminogruppenkonzentration im Test. Es wurden Eichkurven mit Glycin erstellt, bei 4 % Probenzusatz zum Reaktionsgemisch konnte man eine absolute Menge von 20 nmol Aminogruppen sehr gut bestimmen. Dann wurden Cathepsin K- Konzentrationen von 3,1 nM, 31 nM und 46 nM mit Prionex[®] in Zitratpuffer pH 5,0 bei 37 °C inkubiert. Nach 15 und 30 Minuten erfolgten Entnahmen und anschließend die Aminogruppenbestimmung. Eine im Vergleich zur Kontrolle deutliche Erhöhung der Konzentration an freien Aminogruppen im Test würde die Spaltung des Prionex[®] beweisen. Es zeigte sich jedoch, dass alle Messergebnisse mit einer Enzymkonzentration kleiner als 46 nM im Fehlerbereich der Methode lagen. Damit erwies sich die Kombination aus Prionex[®] und Ninhydrinmethode als noch unempfindlicher als die Azocaseinmethode. Deshalb wurde zur wesentlich empfindlicheren Orthophthaldialdehyd-(OPA) Methode gewechselt.

Orthophthaldialdehydmethode:

Die OPA- Methode wurde nach der Vorschrift von Nielsen und Mitarbeitern durchgeführt (Nielsen P. M., Petersen et al. 2001). Die Herstellung des Reagenz erfolgte genau nach Vorschrift und wird ausführlich im Methodenteil, Abschnitt 2.2.9. beschrieben. Es wurden Prionex[®] - Konzentrationen von 6,67 μ M und 3,33 μ M und Cathepsin K- Konzentrationen von 0 nM, 3,1 nM und 31 nM verwendet. Abbildung 26 zeigt, dass es mit steigender Konzentration von Cathepsin K im Ansatz zu einer deutlichen Zunahme der freien Aminogruppen nach Ablauf der Inkubationszeit kommt. Damit ist auch auf diesem Weg der Nachweis der Prionex[®] Spaltung durch Cathepsin K gelungen.

Die genaue Messung der kinetischen Parameter dieser Reaktion erwies sich allerdings als nicht sinnvoll, denn bereits nach dem ersten Experiment ergab eine Abschätzung von k_{cat} einem Wert deutlich kleiner als 1 s^{-1} . Damit ist klar, dass Prionex[®] zwar mit hoher Affinität von Cathepsin K gebunden wird (Abbildung 24), aber zumindest unter unseren Versuchsbedingungen nur sehr langsam umgesetzt wird. Damit ist auch dieses Proteinsubstrat für die vorgesehene Verwendung nicht zu nutzen.

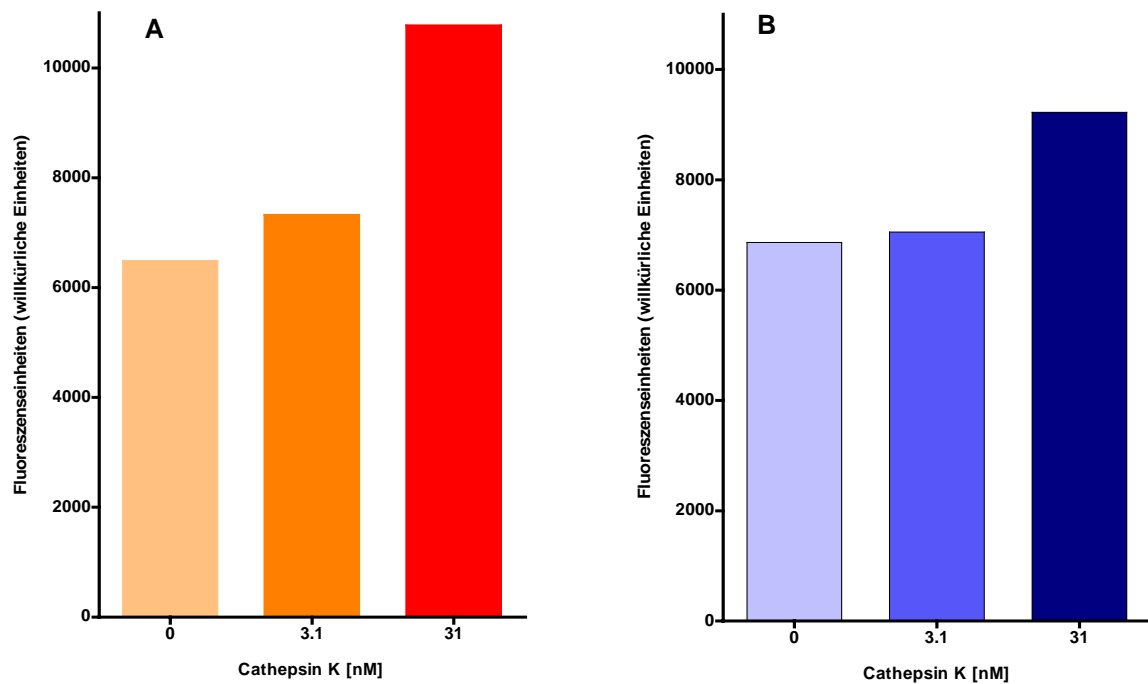


Abbildung 26: Nachweis der Prionex[®] - Spaltung mit der Orthophthaldialdehydmethode: 3,33 μ M (Abbildungsteil A) beziehungsweise 6,66 μ M Prionex[®] (Abbildungsteil B) wurden mit 0 nM, 3,1 nM und 31 nM Cathepsin K in Zitratpuffer pH 5,0 für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Inkubationsgemisch so verdünnt, dass in beiden Ansätzen die gleiche nominelle Prionex[®] Konzentration von 66 nM vorlag. Durchführung der Orthophthaldialdehydmethode wie in Abschnitt 2.2.9. beschrieben.

4.4. Nachweis von renaturiertem Cathepsin K nach Trennung vom inhibierenden Propeptid

Die Inhibition des Cathepsin K durch sein Propeptid erfolgt mit einer so hohen Affinität, dass es nicht gelang, ein Verfahren zu entwickeln, das empfindlich genug wäre, um geringe Mengen an renaturiertem Cathepsin K in Gegenwart seines inhibierenden Propeptids nachweisen zu können. Da sich jedoch Enzym und Propeptid in einigen physiko-chemischen Eigenschaften deutlich unterscheiden, ergaben sich zahlreiche, in der Zielstellung aufgeführte Möglichkeiten, um das Propeptid in einem Zwischenschritt aus dem Medium zu entfernen und so die Produktbildungsrate und damit die Empfindlichkeit des abschließenden enzymatischen Nachweises zu steigern. Von den aufgeführten Möglichkeiten wurden die folgenden beiden geprüft.

4.4.1. Abtrennung des Propeptids vom reifen Enzym durch Diafiltration

Cathepsin K hat ein Molekulargewicht von ca. 29000 Dalton, sein Propeptid von ca. 11000 Dalton (Schlabrakowski 2003), deshalb bot sich eine Trennung auf der Grundlage der Molekulargewichtsunterschiede an. Zu diesem Zweck wurden Microcon[®]-Konzentrierungshülsen (Amicon) getestet, die für unterschiedliche Molekulargewichtsbereiche angeboten werden: YM 10, YM 30, YM 50 und YM 100; die Zahl gibt jeweils die vom Hersteller genannte Ausschlussgrenze in kDa für globuläre Proteine an. Das Verfahren wurde auch deshalb geprüft, weil es zu einer Konzentrierung des Enzyms führt, ein vorteilhafter Nebeneffekt zur Steigerung der Nachweisgrenze. In Vorversuchen, die im Methodenkapitel ausführlich beschrieben sind, wurde die Durchlässigkeit der Membranen für das Cathepsin K Propeptid folgendermaßen geprüft: Die Hülsen wurden mit einer wässrigen Propeptidlösung gefüllt und genau nach den Vorgaben des Herstellers zentrifugiert. Anschließend wurde die Hemmwirkung von Retentat und Filtrat auf Cathepsin K im fluorometrischen Standardtest mit der Ausgangslösung vor der Zentrifugation verglichen. Mit allen vier geprüften Microcon[®]-Hülsen ergaben sich prinzipiell übereinstimmende Ergebnisse, Abbildung 27 zeigt beispielhaft den Versuch mit dem Typ YM 100. Im Filtrat fanden sich allenfalls Spuren an Propeptid, die Hemmwirkung des Retentats ist trotz des verminderten Volumens etwas geringer als die der Ausgangslösung. Das spricht für einen erheblichen Verlust an „wirksamen“ Propeptid, vermutlich erfolgt eine erhebliche Bindung an die Diafiltrationsmembran und die Oberflächen der Kunststoffteile. Dieses Ergebnis ist eindeutig, die einfache Methode der Auftrennung von Enzym und Propeptid durch Microcon[®]-Hülsen ist nicht einsetzbar. Die übrigen in der Zielstellung gelisteten Trennverfahren wären mit einem erheblich größeren

experimentellen Aufwand verbunden gewesen, so dass erst einmal die Prüfung einfacher Verfahren zur spezifischen Zerstörung des Propeptids naheliegender war.

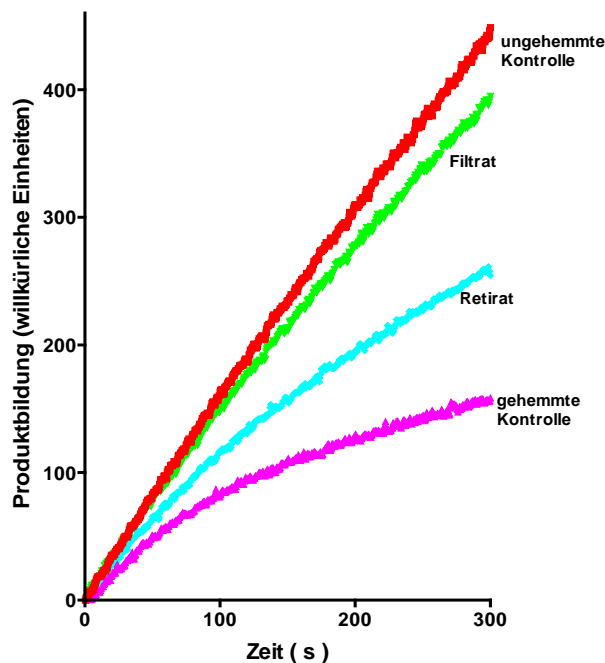


Abbildung 27: Testung der Durchlässigkeit von Microcon®-Hülsen YM 100 für das Propeptid des Cathepsin K. Nach der Zentrifugation einer 1 μ M Propeptidlösung wurden Aliquots von Filtrat und Retentat in den fluorometrischen Test (100 mM NaPa pH 6,0 / 100 mM NaCl / 1 mM EDTA / 0,01 % Chaps / 5 mM DTT / 0,1 % DMSO und 5 μ M Z-Phe-Arg-AMC) eingesetzt. Die beobachtete Hemmwirkung wurde mit je einer Positiv- und Negativkontrolle verglichen. In allen Tests befanden sich 115 pM Cathepsin K, in der Positivkontrolle 5 nM Propeptid.

4.4.2. Verfahren zur spezifischen Zerstörung des Propeptids

4.4.2.1. Abbau des Cathepsin K- Propeptids durch Cathepsin K

Bei der Planung dieser Experimente war die Orientierung an physiologischen Vorgängen naheliegend, denn auch *in- vivo* kommt es im Verlauf der Zymogenprozessierung zu einer Zerstörung der Proregion. Die physiologische Aktivierung von Procathepsin K findet beispielsweise in den Resorptionszonen des Knochens statt, begünstigt durch lokale pH-Erniedrigung (Brömme, Okamoto et al. 1996; Drake, Dodds et al. 1996). Zwei mögliche Feinmechanismen dieses *in- vivo* Vorgangs werden gegenwärtig diskutiert: Zum einen kann die Proregion durch eine andere Protease abgespalten werden (Brömme, Okamoto et al. 1996), ein Mechanismus, der auch für verwandte Zymogene zutrifft (Nishimura, T. Kawabata et al. 1988; Nishimura, T. Kawabata et al. 1989; Wiederanders and Kirschke 1989; Kawabata, Nishimura et al. 1993; Brömme, Okamoto et al. 1996), andererseits kann die Abspaltung der Proregion durch einen autokatalytischen Prozess stattfinden (Bossard, Tomaszek et al. 1996; McQueney, Amegadzie et al. 1997). Beide Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass sich Procathepsin K durch Fragmentierung des Propeptids auch *in- vitro* bei pH 4,0 und 4°C spontan in reifes Cathepsin K umwandelt, welches anschließend die weitere Umwandlung des

Procathepsin K in Cathepsin K beschleunigt. Das erschien für die Zielstellung vorteilhaft, da so keine weiteren Enzyme in den Test gelangen, welche die anschließende Aktivitätsmessung verfälschen könnten. Deshalb wurde versucht, die Autoprozessierung von Procathepsin K so zu optimieren, dass auch im Überschuss zugesetztes Propeptid vollständig verschwindet, ohne dass das Enzym an Aktivität verliert. Dazu wurde bei einem pH- Wert von 4,0 die Inkubationstemperatur und die Inkubationszeit variiert. Der pH- Wert des Prozessierungsansatzes wurde nach der zitierten Literatur und unseren eigenen Beobachtungen zur pH- Abhängigkeit der Propeptid- Hemmung (Tabelle 2) und der Cathepsin K-Stabilität (Abbildung 7) festgelegt. Cathepsin K mit einem etwa zehnfachen Überschuss an Propeptid wurden nach Ablauf der Komplexbildung in pH 4,0- Prozessierungspuffer überführt und bei Temperaturen von 13 °C bis 28 °C über 1 bis 29 Stunden inkubiert. In definierten Zeitabständen wurden Aliquots zur Messung der Cathepsin K- Aktivität entnommen. In insgesamt sieben Experimenten, von denen drei repräsentative in Abbildung 28 veranschaulicht sind, wurde folgendes festgestellt: Der Abbau des Propeptids durch Cathepsin K findet nur sehr langsam statt. Nach anfänglicher totaler Hemmung des Enzyms durch sein Propeptid kommt es im Verlauf mehrerer Stunden, z. T. bis zu einem Tag, zu einem langsamen Anstieg der Cathepsin K- Aktivität. Die unvermeidliche zeitabhängige Inaktivierung des freien Enzyms führt bei den langen Inkubationszeiten zu einem erheblichen Aktivitätsverlust der Kontrollen ohne Propeptidzusatz. Dieser Prozess überlagert den Aktivitätszuwachs durch den Abbau des Propeptids, so dass die Wiederfindung als Funktion der Inkubationszeit ein Maximum durchläuft. Bezogen auf den initialen Kontrollwert, lag die maximal wiedergefundene Aktivität je nach Inkubationsbedingungen zwischen 5 % und 20 %.

In Abbildung 28 wird der Zeitverlauf der Wiederfindung, bezogen auf die jeweilige Ausgangsaktivität, in drei an verschiedenen Tagen durchgeführten Experimenten gezeigt. Man erkennt die erheblichen Unterschiede sowohl im Verlauf als auch in der Höhe der Kurven. Der Abbau des Cathepsin K- Propeptids durch das Mutterenzym war nicht standardisierbar, das Zeitintervall bis zum Erreichen des Maximums der Wiederfindung schwankt auch bei identischen Messbedingungen zum Teil um mehrere Stunden. Auf mögliche Ursachen dieses überraschenden Ergebnisses wird in der Diskussion eingegangen.

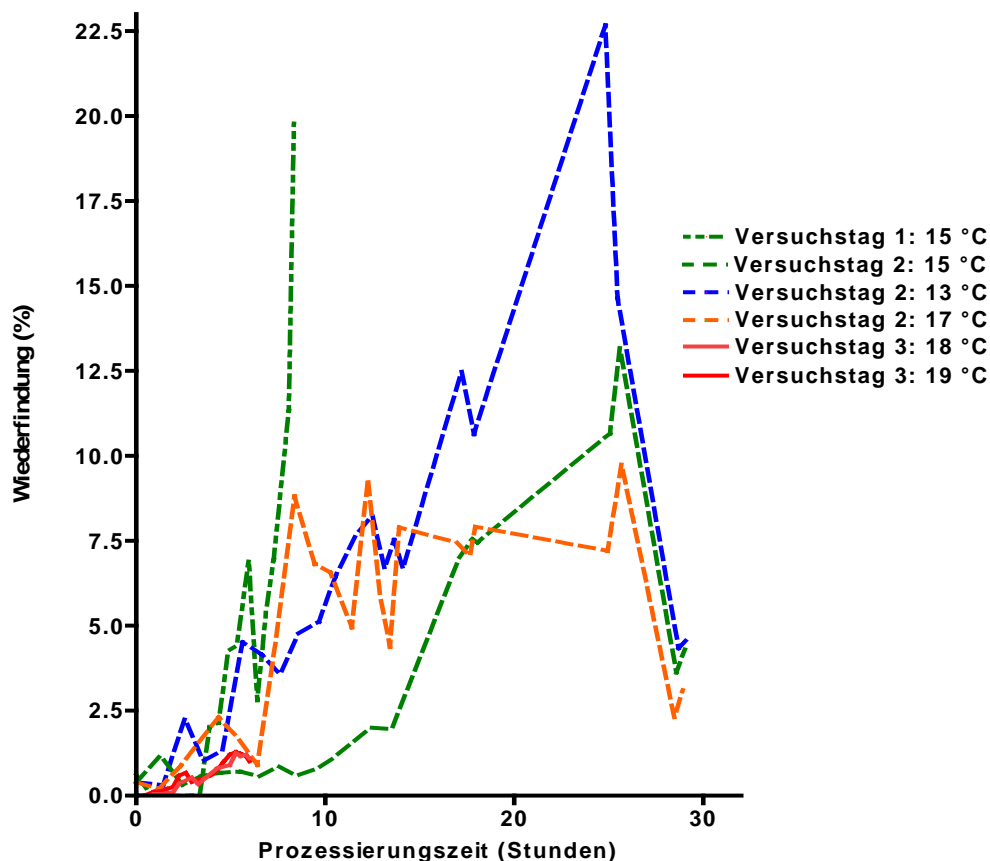


Abbildung 28: Einfluss von Temperatur und Zeit auf den Abbau des Cathepsin K- Propeptids durch das Mutterenzym: Die Versuchsdurchführung wird ausführlich in Materialien und Methoden, Abschnitt 2.2.11. beschrieben. Dargestellt ist die Wiederfindungsrate als Funktion der Inkubationszeit. Die Graphik enthält die Ergebnisse mehrerer Versuchsreihen an verschiedenen Tagen. Unterschiedliche Strichqualität entspricht verschiedenen Versuchstagen.

4.4.2.2. Spezifischer proteolytischer Abbau des Propeptids

Der autokatalytische Abbau des Cathepsin K- Propeptids erwies sich, wie eben gezeigt, als ein extrem langsamer und verlustreicher Prozess. Das war der Startpunkt für die Suche nach Proteasen, die das Propeptid des Cathepsin K spezifisch zerstören oder zumindest so weit abbauen, dass die Fragmente keine nennenswerte inhibitorische Wirksamkeit mehr zeigen. Dabei darf die zugesetzte Protease das Cathepsin K selbst nicht verdauen, denn das würde zu einem unerwünschten Aktivitätsverlust führen. Weiterhin wäre es vorteilhaft, wenn die gesuchte Protease kein AMC aus den im fluorometrischen Test verwendeten synthetischen Peptidsubstrat abspaltet. Sollte die letzte Bedingung nicht erfüllbar sein, würde die Methode durch einen zusätzlichen Reinigungsschritt belastet werden.

Aus der Literatur war zu entnehmen, dass bei der gentechnischen Herstellung von Cathepsin K das entsprechende Zymogen erfolgreich mit Pepsin prozessiert wird (Linnevers, McGrath

et al. 1997; Hou, Brömme et al. 1999; Brömme, Nallaseth et al. 2004). Pepsin ist ein proteolytisches Enzym mit einem pH- Optimum von 1-2. Bei diesem pH ist Cathepsin K nicht mehr stabil. Aus Abbildung 7 geht hervor, dass eine ausreichende Stabilität des Enzyms erst bei $\text{pH} \geq 4$ gegeben ist.

In Übereinstimmung mit der zitierten Arbeit fanden wir in einem Vorversuch, dass auch bei pH 4,0 Pepsin noch wirksam ist, denn der Zusatz von Pepsin zu Propeptid- inhibierten Cathepsin K führte zu einem langsamen Anstieg der Aktivität im fluorometrischen Standardtest. Damit war die entscheidende Voraussetzung für einen Pepsineinsatz erfolgreich geprüft und es wurden nun die eingangs bedachten Details untersucht (Abbildung 29).

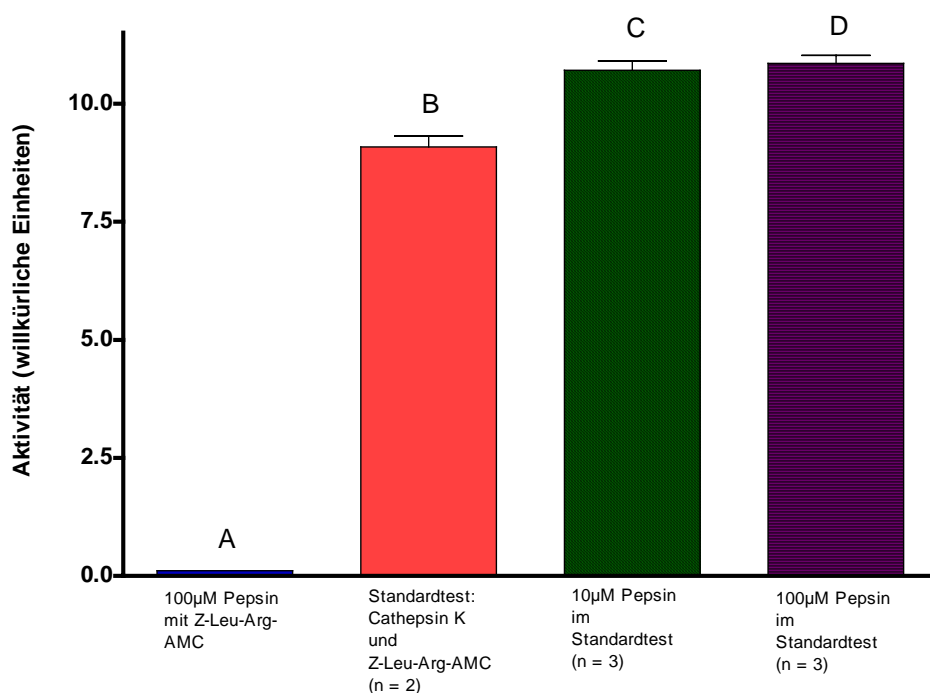


Abbildung 29: Einfluss von Pepsin auf Cathepsin K und Z-Leu-Arg-AMC:

B-D: Inkubation von Cathepsin K in Zitratpuffer pH 4,0 mit den angegebenen Pepsinkonzentrationen für 15 Minuten bei Raumtemperatur, anschließend Enzymaktivitätsmessung im fluorometrischen Standardtest pH 5,0 in der V- MTP bei Raumtemperatur. Substratkonzentration: 20 µM Z-Leu-Arg-AMC, Cathepsin K- Konzentration 0,41 nM.

A: Analoges Startgemisch in pH 4,0 ohne Zusatz von Cathepsin K.

Dazu wurde im fluorometrischen Standardtest die Spaltung von Z-Leu-Arg-AMC durch Cathepsin K und 10 µM bzw. 100 µM Pepsin, einzeln und im Gemisch, verglichen. Wie aus Abbildung 29 zu erkennen ist, wird das Substrat durch Pepsin nicht gespalten (Säule A). Pepsin führt auch nicht zum Aktivitätsverlust des Enzyms, die Reaktionsgeschwindigkeit ist sogar etwas höher als ohne Pepsin (Säulen C und D im Vergleich zur Kontrolle = Säule B). Diese Ergebnisse waren eine ideale Voraussetzung für die anschließende Optimierung der experimentellen Bedingungen zum Abbau des Cathepsin K- Propeptids durch Pepsin. Gemes-

sen wurde der Zeitverlauf der Wiederfindung von Cathepsin K- Aktivität nach vollständiger Hemmung durch das Propeptid in Abhängigkeit von der Pepsinkonzentration und der Temperatur. Untersucht wurden Pepsinkonzentrationen von 1 nM bis 100 μ M. Es stellte sich heraus, dass lediglich der Einsatz sehr hoher Pepsinkonzentrationen von 75 μ M bis 100 μ M zu einer raschen und fast vollständigen Wiederfindung der Cathepsin K- Aktivität führt. Das waren Pepsinkonzentrationen, die über denen von Enzym und Propeptid lagen - ein unerwartetes Ergebnis. Deshalb wurde die Aktivität der verwendeten Pepsin- Charge mit einem chromogenen Substrat vermessen. Es ergab sich eine nahezu perfekte Übereinstimmung zwischen gemessener und aus der Einwaage berechneter Enzymkonzentration (Abschnitt 2.2.12. Methodenteil, Abbildung 3). Auch bei Experimenten mit einer anderen Pepsincharge waren so hohe Konzentrationen notwendig, vermutlich zur Kompensation eines dramatischen Aktivitätsverlustes dieses Enzyms bei pH 4,0. Da die Aufklärung des Feinmechanismus des Propeptidabbaus durch Pepsin nicht Gegenstand der Arbeit war, wurden zu dieser Frage keine weiteren Experimente durchgeführt.

Neben der Pepsinkonzentration wurde auch die Temperatur in einem weiten Bereich (4 °C bis 25 °C) variiert. Abbildung 30 zeigt dazu repräsentative Ergebnisse.

Wie zu erwarten, ist der Zeitverlauf des Propeptid- Abbaus ein stark temperaturabhängiger Prozess. Bei Temperaturen zwischen 16 °C und 20 °C kommt es bereits innerhalb weniger Minuten zu einem starken Anstieg der Cathepsin K- Aktivität, der Abbau des Propeptids findet also sehr schnell statt. Bei 4 °C ist dieser Prozess deutlich langsamer, so dass erst nach ca. drei Stunden der Kontrollwert ohne Propeptidzusatz wieder erreicht wird. Ein Vergleich der Kontrollen zwischen beiden Versuchsreihen zeigt, dass auch der Aktivitätsverlust von Cathepsin K mit zunehmender Temperatur zunimmt. Diese Tatsache begrenzt den zur Prozessierung nutzbaren Temperaturbereich nach oben. Für die nachfolgenden Berechnungen wurde ein linearer Zeitverlauf des Aktivitätsverlustes der Kontrollen angenommen, in Teilabbildung 30B ist die Regressionsgerade auch eingezeichnet. Bei 4 °C errechnet man so für die Kontrolle nach 180 Minuten Inkubationszeit noch 94 % der Anfangsaktivität. Durch Abbau des Propeptids erreicht dieser Ansatz nach einem Zeitraum von 150 Minuten wieder ca. 85 % der Anfangsgeschwindigkeit der Kontrollen. Bei den Messungen nahe der Raumtemperatur (Abbildungsteil 30A) führt die Inaktivierung des Cathepsin K bei pH 4,0 schon nach 30 Minuten zu einem Aktivitätsabfall auf 72 % des Anfangswertes. Diese unvermeidliche Inaktivierung verhindert Wiederfindungen von 100 %.

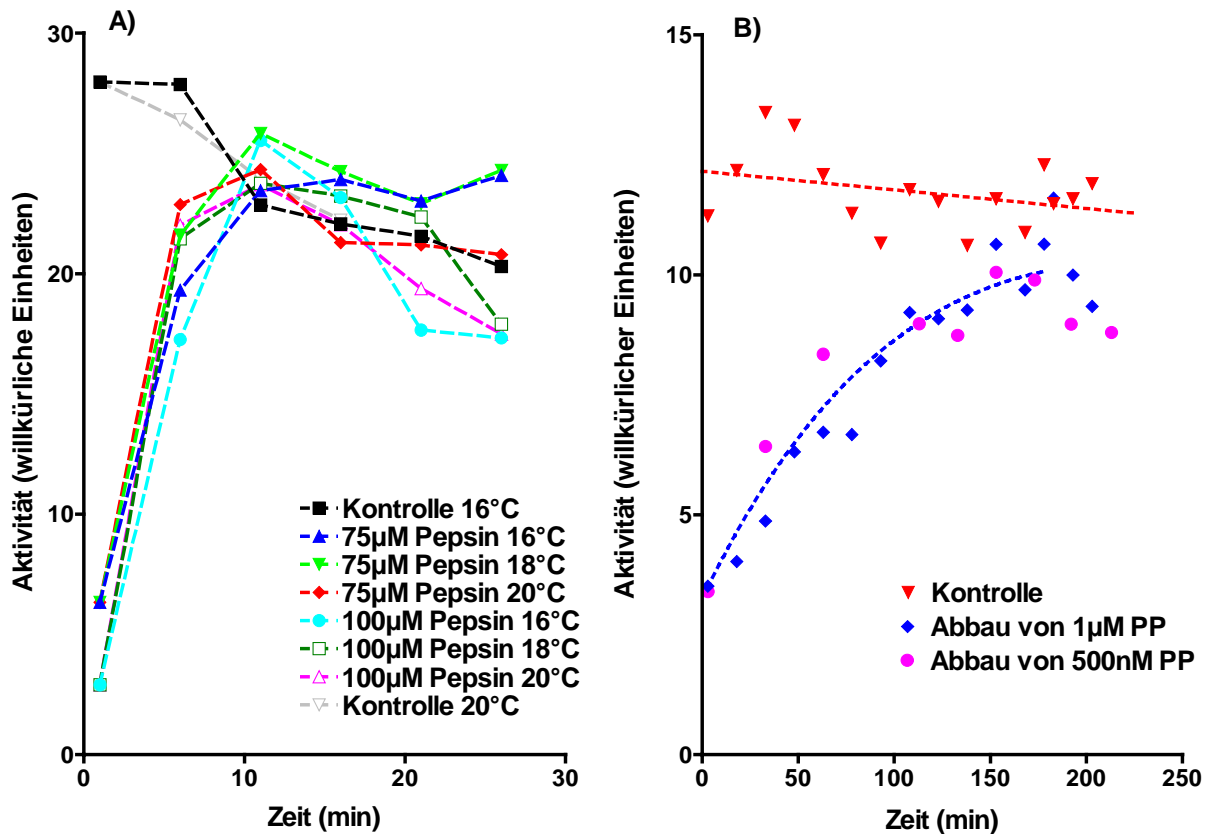


Abbildung 30: Zeit-, Konzentrations- und Temperaturabhängigkeit des Abbaus des Cathepsin K- Propeptids durch Pepsin. Versuchsdurchführung wie in Materialien und Methoden, Abschnitt 2.2.12. ausführlich beschrieben.

Abbildungsteil A: Prozessierung bei Temperaturen von 16 °C bis 20 °C: Im Prozessierungsansatz befanden sich 1µM Propeptid, 12,33 nM Cathepsin K und 75µM bzw. 100 µM Pepsin.

Abbildungsteil B: Prozessierung bei 4°C. Im Prozessierungsansatz befanden sich 500 nM bzw. 1 µM Propeptid, 12,33 nM Cathepsin k und 100 µM Pepsin.

Man erkennt jedoch, dass bei Inkubation nahe der Raumtemperatur bereits nach 10 Minuten das Maximum der wiedergefundenen Aktivität erreicht ist. Es schließt sich ein Intervall an, in dem die wiedergefundene Aktivität nahezu konstant bleibt. Dies ist vermutlich das Resultat aus parallel ablaufender Inaktivierung des freien Enzyms und Freisetzung von neuem Cathepsin K durch Abbau des Propeptids. Im Bereich dieses Plateaus werden ca. 80 % der Cathepsin K- Anfangsaktivität wiedergefunden.

Aus Abbildung 30A ist weiterhin ersichtlich, dass im Bereich der untersuchten Pepsinkonzentrationen von 75 µM bis 100 µM und Inkubationstemperaturen von 16 °C bis 20 °C der Zeitverlauf der Propeptidzerstörung durch Pepsin nur unwesentlich von den äußeren Bedingungen abhängt. Die geringen Unterschiede zwischen den Messreihen zeigten keine systematischen Tendenzen bezüglich Pepsinkonzentration und Temperatur und wurden deshalb als zufällige Schwankungen interpretiert. Das ermöglichte im konkreten Fall die Mittelwertbildung bei der Auswertung, ist aber vor allem ein entscheidender Vorteil bei der

praktischen Nutzung des Verfahrens. Unvermeidliche kleine Unterschiede in den Versuchsabläufen von Tag zu Tag haben damit keinen über den ohnehin gegebenen Messfehler der Enzymaktivitätsbestimmung hinausgehenden Einfluss auf das Messergebnis. Das Ergebnis dieser Untersuchungen belegt, dass kommerziell erhältliches Pepsin für den selektiven Abbau des Cathepsin K- Propeptids gut geeignet ist. Pepsin erfüllt die einführend genannte Liste von Forderungen an eine solche Protease in idealer Weise: es hat keinen messbaren Einfluss auf die Stabilität von Cathepsin K und auf den Umsatz des fluorogenen Substrates Z-Leu-Arg-AMC. So wurden Prozessbedingungen gefunden, bei denen es auch bei einem erheblichen Überschuss an inhibitorischem Propeptid zu einer guten Wiederfindung der Enzymaktivität kommt. Die Optima des Prozesses bezüglich Pepsinkonzentration, Inkubationstemperatur und Inkubationszeit sind breit, das verbessert die Praktikabilität der Methode.

5. Diskussion

Cathepsin K gehört zur Papain- Familie der Cysteinproteasen. Strukturvergleiche zwischen Zymogenen und Enzymen zeigten, dass bei diesen Proteasen das aktive Zentrum bereits im Vorläufermolekül vollständig strukturiert ist, aber durch eine N- terminale Pro-Sequenz inhibiert wird (Cygler and Mort 1997). Die Primärstruktur der Prosequenz unterscheidet sich erheblich, die Länge variiert zwischen 38 (Cathepsin X) und 251 Aminosäuren (Cathepsin F) (Brömme, Nallaseth et al. 2004). Das ist die Grundlage der Klassifizierung in drei Unterfamilien, die als Cathepsin F-, L- und B- ähnliche Cysteinproteinasen bezeichnet werden (Karrer, Peiffer et al. 1993; Kirschke, Barrett et al. 1995; Wang, Shi et al. 1998; Wex, Levy et al. 1999). Procathepsin K hat eine 15 Aminosäuren lange Signalsequenz und eine sich anschließende 99 Aminosäuren lange Proregion, typisch für die Cathepsin L-ähnliche Unterfamilie (Brömme and Okamoto 1995; Bossard, Tomaszek et al. 1996). Die vordergründige Funktion der Proregion ist zweifellos die Inhibition des Mutterenzym. Es konnte gezeigt werden, dass die Proregion vieler Cysteinproteinasen diese Eigenschaft auch im freien, nicht-kovalent gebundenen Zustand, als sogenanntes Propeptid, behält (Mason, Gal et al. 1987; Fox, de Miguel et al. 1992; Li, Hu et al. 1995; Volkel, Kurz et al. 1996; Maubach, Schilling et al. 1997; Nomura and Fujisawa 1997; Visal, Taylor et al. 1998; Billington, Mason et al. 2000; Guay, Falgueyret et al. 2000). Neben der inhibierenden Funktion hat die Proregion auch noch Bedeutung für die Enzymstabilität: Die Enzym- Propeptid- Komplexe sind langlebiger als die freien Proteasen (Mason, Gal et al. 1987; Nomura and Fujisawa 1997). Ob diese Stabilisierung nur auf die Inhibition der Proteaseaktivität und damit auf die Verhinderung der intermolekularen Degradation zurückzuführen ist, oder ob noch weitere Aspekte eine Rolle spielen, ist bisher nicht untersucht worden. Auch die Bedeutung der Proregion für die Zielsteuerung der Cysteinproteasen ist immer wieder Gegenstand von Untersuchungen (McIntyre, Godbold et al. 1994; Chapman, Kane et al. 1997; Nissler, Kreusch et al. 1998). Seit sich das wissenschaftliche Interesse von den proteolytischen Enzymen an sich auch den zugehörigen Proregionen zugewandt hat, gibt es indirekte Hinweise auf eine essentielle Rolle der Proregion für die korrekte Faltung einzelner Enzyme, die sogenannte Foldasefunktion.

Es ist schon länger bekannt, dass selbst bei nahe verwandten Proteinen unterschiedliche Faltungskinetiken zur Ausbildung der reifen Proteinstruktur führen können. So falten beispielsweise die bakteriellen Proteine Im7 und Im9 mittels Mechanismen unterschiedlicher kinetischer Komplexität (Friel C. T., A. P. Capaldi . et al. 2003). Beispiele dafür, dass die Evolution selbst innerhalb einer Enzymfamilie grundsätzlich verschiedene Mechanismen, spontan bzw. Foldase- katalysiert, zur Faltung der reifen Enzyme hervorgebracht hat, sind

bisher aber noch nicht publiziert worden. Daran wird in der eigenen Gruppe am Beispiel der Papain- Familie gearbeitet.

Die korrekte Faltung ist die Voraussetzung für die Fähigkeit eines Proteins das ER zu verlassen, für die Glykosylierung im Golgi- Feld und damit auch für die Ausbildung des Mannose- 6- phosphat- Motivs. Letzteres ist die entscheidende Voraussetzung für den Transport in die Lysosomen (Sandoval and Bakke 1994; Zhang, Braakman et al. 1997). Solche *in- vivo* Untersuchungen wurden für Proregion- mutierte Procathepsine L und S publiziert (Tao, Stearns et al. 1994; Kreusch, Fehn et al. 2000). Der *in- vitro* Nachweis der Foldasefunktion erfolgte bisher für die Cathepsine L und S durch die Messung der Propeptid- abhängigen Renaturierung der denaturierten Enzyme (Yamamoto, Watabe et al. 1999; Pietschmann, Fehn et al. 2002). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, gibt es auch für das nahe verwandte Cathepsin K indirekte Hinweise auf eine Foldasefunktion der Proregion (Hou, Brömme et al. 1999).

Die Renaturierung des Cathepsin S durch sein Propeptid wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits detailliert untersucht (Pietschmann, Fehn et al. 2002). Zur Propeptid- katalysierten Renaturierung von Cathepsin L aus der Seidenraupe war etwa zeitgleich eine Veröffentlichung erschienen, leider ohne die für einen aussagekräftigen Vergleich notwendigen Details (Yamamoto, Watabe et al. 1999). Da war es naheliegend, selbst bei nahe verwandten Enzymen *in- vitro* nach Übereinstimmungen und Unterschieden bei der Propeptid- katalysierten Renaturierung zu suchen. Solche Untersuchungen sind bisher noch in keiner Enzym- klasse durchgeführt worden. Die Verfügbarkeit von rekombinantem Cathepsin K aus Hefe war dazu eine ideale Voraussetzung, denn durch die Glykosylierung des Enzyms war ein wichtiger Unterschied zum Kohlenhydrat- freien Cathepsin S gegeben (Brömme and Okamoto 1995). Diese Untersuchung sollte auch erste Ergebnisse zur Spezifität der Faltungskatalyse bringen, was durch einen Vergleich der Renaturierungskinetiken dieser beiden Enzyme in Gegenwart der eigenen Propeptide mit denen in Gegenwart des Propeptides des jeweils anderen Enzyms gut möglich gewesen wäre. Das war die Fragestellung zu Beginn der vorliegenden Arbeit.

Der beste Nachweis einer erfolgreichen Renaturierung von Enzymen erfolgt durch Messung der Aktivität (Sarat G. 1994). Das ist wegen der hohen Empfindlichkeit von Aktivitätsmessungen in vielen Fällen auch das Verfahren mit dem geringsten Verbrauch an Enzymprotein. Die Verwendung des Aktivitätstests als Hilfsreaktion zum Nachweis einer korrekten Faltung des Cathepsin K war also naheliegend. Die Anwesenheit des Propeptids als starker Inhibitor der Enzymaktivität erschien dabei zwar ein Problem, aber nach sehr guten

Erfahrungen in der Arbeitsgruppe bei der Messung von Cathepsin S unter vergleichbaren Bedingungen, ein lösbares. Beim Cathepsin S- Nachweis in Gegenwart seines Propeptides konnte die starke pH- Abhängigkeit dieser Inhibitionsreaktion ausgenutzt werden, bei pH 4,0 war die Hemmwirkung des Propeptides verschwunden, das Enzym hatte noch etwa 50 % seiner Maximalaktivität und die Stabilität blieb erhalten (Pietschmann 2002). Zu den Cathepsinen B und L gibt es ältere Literaturdaten, die eine ähnliche pH- Abhängigkeit der Inhibition belegen (Fox, de Miguel et al. 1992; Carmona, Dufour et al. 1996). Für Cathepsin K beschrieben Billington und Mitarbeiter in einer zum Zeitpunkt der Planung dieses Projektes aktuellen Arbeit einen Anstieg des K_i von 2,61 nM auf 147 nM bei Absenkung des pH von 6,0 auf 4,0 (Billington, Mason et al. 2000). Zur Aktivitätsmessung von Cathepsin K findet man in der Literatur zahlreiche praktikable Vorschriften, denn wegen seiner klinischen Relevanz wurde es in den letzten Jahren intensiv untersucht (Tezuka, Tezuka et al. 1994; Inaoka, Bilbe et al. 1995; Brömme, Okamoto et al. 1996; Drake, Dodds et al. 1996; Gelb, Shi et al. 1996; Hummel, Petrow et al. 1998; Gowen, Lazner et al. 1999; Hou, Brömme et al. 1999; Fujita, Nakata et al. 2000). Meist wird der fluorometrische Test mit Detektion der Freisetzung von Aminomethylcoumarin aus fluorogenen Peptidsubstraten genutzt (Bossard, Tomaszek et al. 1996; Brömme, Okamoto et al. 1996; McQueney, Amegadzie et al. 1997; Hou, Brömme et al. 1999; Billington, Mason et al. 2000; McGrath, Sprengeler et al. 2003). Das erschien als eine fast optimale Ausgangslage, um die skizzierten Untersuchungen zur Foldase- gesteuerten Renaturierung des Cathepsin K relativ zügig verwirklichen zu können. Nachdem jedoch zwei der hier aufgeführten Resultate trotz längerer sorgfältiger experimenteller Bemühungen nicht reproduziert werden konnten, wurde die Messung der Cathepsin K- Aktivität unter Renaturierungsbedingungen das Thema dieser Arbeit.

Als erstes wurde das fluorometrische Testverfahren für Cathepsin K so optimiert, dass es möglichst empfindlich wird. Das begann mit der Wahl des Puffersystems. In der Literatur findet man Angaben zur Verwendung von Azetatpuffer (Brömme, Okamoto et al. 1996; McQueney, Amegadzie et al. 1997; Hou, Brömme et al. 1999) und Zitratpuffer (Billington, Mason et al. 2000), jedoch keine Hinweise auf mögliche Vor- und Nachteile der beiden Puffersysteme. Vergleichende Untersuchungen sind überhaupt nicht publiziert worden. Ein Vergleich der Aktivität und Stabilität von Cathepsin K in beiden Puffersystemen bei pH 4,0 und 5,0 zeigte, dass bezüglich der Aktivität nur bei pH 5,0 beide Puffer gleichwertig sind, ansonsten ist der Zitratpuffer dem Azetatpuffer deutlich überlegen (Abbildung 6).

Zur Stabilisierung der SH- Gruppe im aktiven Zentrum von Cysteinproteasen muss dem Test ein reduzierendes Agens zugesetzt werden. In der Literatur fanden sich Angaben zur

Verwendung von DTT (Billington, Mason et al. 2000; McGrath, Sprengeler et al. 2003) und Cystein (Bossard, Tomaszek et al. 1996; McQueney, Amegadzie et al. 1997) in unterschiedlichen Konzentrationen. Auch hier gab es keine vergleichenden Untersuchungen. Die durchgeführten Experimente zeigten zwischen DTT und Cystein auch über einen sehr langen Messzeitraum nur sehr geringe Unterschiede (Abbildung 8), mit einem allenfalls geringfügigen Vorteil für Cystein. Dies bedeutet, dass es prinzipiell egal ist, welches Agens man verwendet, wichtig ist vor allem der Konzentrationsbereich.

Die pH- Abhängigkeit der Cathepsin K- Aktivität wurde von Brömme und Mitarbeitern bei 25 °C bestimmt. Sie fanden ein breites Plateau von pH 5,0 bis pH 7,0 mit relativ steilem Abfall der Aktivität unterhalb pH 5,0. Das Optimum lag zwischen 6,0 und 6,5 (Brömme, Okamoto et al. 1996). In den meisten Untersuchungen wird entweder dieses Optimum (Linnevers, McGrath et al. 1997; Billington, Mason et al. 2000), oder pH 5,5 genutzt (Bossard, Tomaszek et al. 1996; McQueney, Amegadzie et al. 1997). In Vorbereitung der geplanten Renaturierungsversuche wurden Aktivität und Stabilität von Cathepsin K sogar noch bis pH 8,0 bei 20 °C und 37 °C untersucht (Abbildung 7). Es fand sich bei 20°C ebenfalls ein breites pH- Optimum, allerdings war in diesen Experimenten der Aktivitätsabfall zwischen pH 5,0 und 4,0, nicht so ausgeprägt (Abbildung 7). Dieser Unterschied zu den Ergebnissen von Brömme und Mitarbeitern kann in der eingesetzten Substratkonzentration begründet sein. Substrate stabilisieren in der Regel Enzyme. Während Brömme und Mitarbeiter mit einer sehr niedrigen Konzentration von 1 µM Z-Leu-Arg-AMC arbeiteten, wurden hier von diesem Substrat 18µM eingesetzt. Das könnte somit die Ursache für die festgestellte bessere Stabilität im sauren Bereich sein. Die gute Stabilität von Cathepsin K bei pH 8,0 ist ein in Hinblick auf die geplante Renaturierung günstiges Ergebnis: Bei der vollständigen Denaturierung kommt es zur Aufspaltung aller Disulfidbrücken, für eine komplette Renaturierung ist somit ein effektives S- S- Reshuffling nötig. Dieses S- S- Reshuffling wird durch einen leicht alkalischen pH begünstigt (Rudolph, Böhm et al. 1997). Die gute Stabilität des Cathepsin K in diesem pH- Bereich ermöglicht somit die Durchführung des S- S- Reshuffling unter günstigen Bedingungen.

Für Cathepsin K existieren zwei Arbeiten, in denen die Spezifität des Enzyms gegenüber verschiedenen fluorogenen Substraten untersucht wurde (Bossard, Tomaszek et al. 1996; Brömme, Okamoto et al. 1996). In beiden Arbeiten wurde übereinstimmend Z-Leu-Arg-AMC als das Substrat mit dem besten Verhältnis k_{cat} / K_M ermittelt. Nur wenig schlechter war Z-Phe-Arg-AMC, das in der Vergangenheit aus praktischen Gründen für fast alle Routinemessungen verwendet wurde (McQueney, Amegadzie et al. 1997; Billington, Mason

et al. 2000; McGrath, Sprengeler et al. 2003). Bossard und Mitarbeiter weisen in einer Fußnote zur Tabelle mit den K_M - Werten darauf hin, dass für Z-Leu-Arg-AMC und Z-Phe-Arg-AMC in sehr hohen Konzentrationen Substrathemmung beobachtet wurde (Bossard, Tomaszek et al. 1996). Weitergehende Ausführungen wurden hier nicht gemacht, auch in späteren Publikationen wurde dieses Problem nicht wieder aufgegriffen. Wir begannen die Arbeit mit Experimenten zur Bestimmung des K_M - Wertes für das in den einschlägigen Publikationen am häufigsten verwendete Substrat Z-Phe-Arg-AMC und mussten feststellen, dass es zumindest unter unseren experimentellen Bedingungen zu einer ausgeprägten Substrathemmung in einem bereits für eine sorgfältige K_M - Bestimmung relevanten Bereich kommt (Abbildung 9 und 10). Mit den anderen beiden Substraten erzielten wir ähnliche Ergebnisse (Abbildung 11 und 12). Eine mögliche Ursache der Unterschiede zwischen diesen Ergebnissen und den Literaturangaben könnte die DMSO- Konzentration im Test sein, die bei Bossard und Mitarbeitern bei 10 % lag (Bossard, Tomaszek et al. 1996). Deshalb wurde auch der Einfluss von DMSO als Lösungsvermittler des Substrates untersucht. Die Literaturangaben zur DMSO- Konzentration im Test variieren erheblich. So verwenden Brömme und Mitarbeiter beispielsweise nur die Menge, die zwangsläufig durch die Substratzugabe in den Test gelangt (Brömme, Okamoto et al. 1996). In der Arbeit von Bossard und Mitarbeitern gibt es eine kurze Notiz, dass kein Einfluss von DMSO auf die Enzymaktivität und kinetische Parameter gefunden wurde. In den eigenen Experimenten wurde für alle Substrate eine Abhängigkeit der Enzymaktivität von der DMSO- Konzentration im Test festgestellt. Mit steigender DMSO- Konzentration im Test wird der K_M - Wert größer, bei annähernd gleichbleibendem k_{cat} bzw. V_{max} (Abbildung 16 und 17, Tabelle 1). Die Affinität des Substrates zum aktiven Zentrum des Cathepsin K wird also durch DMSO reduziert.

Um sicher zu gehen, dass sich hinter der Substrathemmung nicht einfach nur Substratlöslichkeitsprobleme verbergen, wurden eine Reihe von Zusatzexperimenten durchgeführt. Der Inhalt der Küvetten wurde nach dem fluorometrischen Test zusätzlich noch turbidometrisch am Photometer vermessen. Lichtschwächung im sichtbaren Spektralbereich führte zum Ausschluss der entsprechenden Messung von der Auswertung. Überzeugend erscheint auch die Tatsache, dass es in einer Testreihe mit Cathepsin L und dem Substrat Z-Phe-Arg-AMC bei identischen Testbedingungen und identischen Substratkonzentrationen im Gegensatz zu Cathepsin K zu keinem Abfall der Aktivität bei hohen Substratkonzentrationen kam (Abbildung 14).

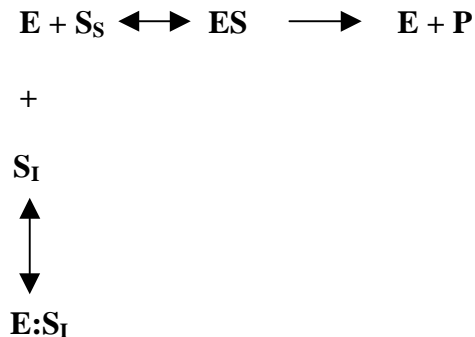
Ein selten genutztes Verfahren zur K_M - Bestimmung ist die Auswertung des Zeitverlaufs der Produktbildung bei Totalhydrolyse hoher Substratkonzentrationen. Wir konnten mit dieser

Methode die Richtigkeit unserer mit dem Standardverfahren ermittelten Konstanten bestätigen, vor allem aber durch Registrierung von Progresskurven mit einem Wendepunkt (leicht S- förmiger Kurvenverlauf) einen zweiten, unabhängigen Beweis für die Substrathemmung durch Z-Phe-Arg-AMC und Z-Leu-Arg-AMC erbringen (Abbildung 15). Darüber hinaus brachten diese Experimente eine systematische Differenz zwischen den gravimetrisch und photometrisch ermittelten Substratkonzentrationen ans Licht. In allen drei Fällen war der photometrische Wert geringer, so dass zufällige Wägefehler unwahrscheinlich sind. Den möglichen Ursachen dieser Diskrepanz wurde nicht nachgegangen.

Für Cathepsin L wird gelegentlich Produkthemmung diskutiert (pers. Mitteilung von Prof. Brömme und Hinweis in der Arbeitsanweisung „Postgraduate Course on Kinetics“ anlässlich des 2nd General Meeting of the IPS 2002 in München). Produkthemmung könnte bei einer K_M - Bestimmung durch Endpunktmessungen das Phänomen Substrathemmung vortäuschen. Da die in kinetischen Messungen aufgezeichneten Produktbildungs- Zeit- Kurven einen linearen Verlauf zeigten und nicht die mittleren, sondern die Anfangsgeschwindigkeiten mit steigender Substratkonzentration zunächst zu-, dann aber wieder abnahmen, kann die inhibierende Wirkung auf die Enzymaktivität nur von den AMC- Substraten selbst und nicht von den Produkten ausgehen. Ein hemmender Einfluss der Produkte würde bei dem durchgeführten experimentellen Vorgehen zu einer mit fortschreitender Beobachtungszeit zunehmenden Krümmung der Produktbildungs- Zeit- Kurven führen, die nie beobachtet wurde.

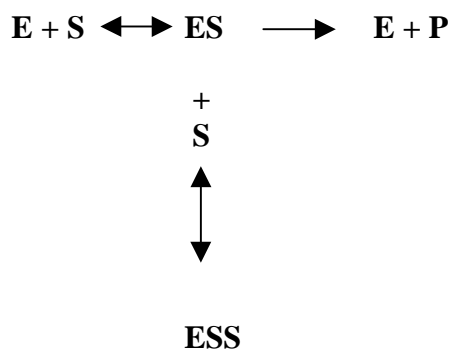
In qualitativer Übereinstimmung mit dem von Bossard und Mitarbeitern publizierten Hinweis zeigen die Ergebnisse, dass bei der Reaktion des Cathepsin K mit seinen drei besten fluorogenen Substraten Z-Phe-Arg-AMC, Z-Leu-Arg-AMC und auch Z-Val-Arg-AMC Substrathemmung auftritt. Das Ausmaß dieser Hemmung ist abhängig vom verwendeten Substrat selbst, vor allem aber von der DMSO-Konzentration im Test. Substrathemmungen werden in den Handbüchern der Enzymkinetik (Cleland 1979) detailliert beschrieben, in der Laborpraxis aber vergleichsweise selten beobachtet. Eine Medline- Recherche mit den Stichworten „protease“ und „substrate inhibition“ ergab für den gesamten elektronisch erfassten Zeitraum nur drei Treffer (Stein, Melandri et al. 1996; Salvati, Mattu et al. 2001; Venäläinen, Juvonen et al. 2002). Das Phänomen der Substrathemmung kann danach sehr unterschiedliche Ursachen haben, für hydrolytische Enzyme, zu denen die Proteasen gehören, sind zwei einfache Grundvorstellungen relevant:

1. Durch „falsche“ Einlagerung des Substrates in das aktive Zentrum bildet sich ein unproduktiver Enzym- Substrat- Komplex.



Schema 3: (Salvati, Mattu et al. 2001)
 S_S : Substrat fungiert als Substrat
 S_I : Substrat fungiert als Inhibitor
 ES : korrekter (produktiver) Enzym-Substrat-Komplex
 E:S_I : unproduktiver Enzym-Substrat-Komplex

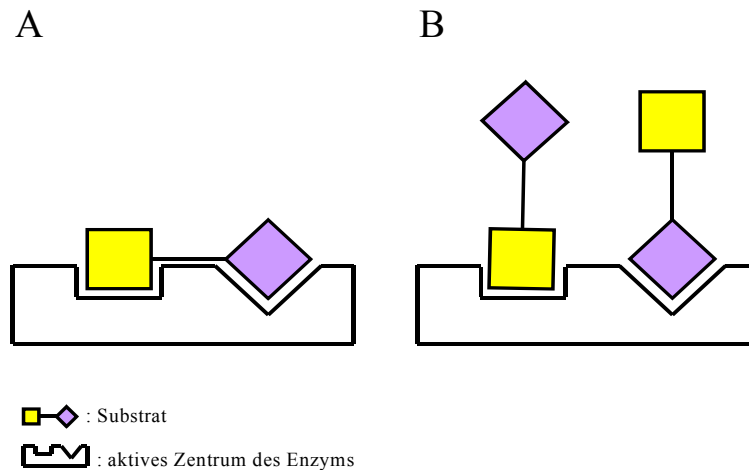
2. Bei der Verwendung kurzer artifizieller Substrate kann sich an den Enzym-Substrat-Komplex ein zweites Substratmolekül anlagern und die Produktabspaltung verhindern.



Schema 4 (Schellenberger and Fischer 1989)
 E : Enzym; S : Substrat; P : Produkt
 ES : Enzym- Substrat- Komplex
 ESS : Enzym- Substrat- Substrat-Komplex

Cleland differenziert in diesem Fall noch zwischen zwei Varianten:

- 2.1. Bei Hydrolasen, die ein kovalentes Intermediat bilden, kann, nachdem das erste Substratmolekül bereits hydrolysiert, aber das N- terminale Fragment noch kovalent an das katalytische Zentrum gebunden ist, ein zweites Substratmolekül an das aktive Zentrum binden und die Regeneration des Enzyms blockieren.
- 2.2. Beide Substratmoleküle sind in intakter Form mit dem Enzym verbunden und blockieren wechselseitig ihre Umwandlung in das oder die Produkte (Schema 5B).



Schema 5: Schematische Darstellung der Vorstellung über die Substrathemmung (Silverman 2002):

A: korrekte Einlagerung des Substrates ins aktive Zentrum des Enzyms; die Spaltung des Substrates in die Produkte ist möglich
 B: in die beiden „Bindungsorte“ des aktiven Zentrums lagern sich zwei Substrate mit dem jeweils kompatiblen Ende ein, die Spaltung in die Produkte ist hier nicht möglich.

Nur der in Schema 4 skizzierte Mechanismus führt zu einem Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit, wenn die Substratkonzentration eine spezifische Konzentrationsschwelle (S_{opt}) übersteigt. Dann gilt für die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit (v) von der Substratkonzentration ($[S]$) Gleichung 5 (siehe Methodik Abschnitt 2.2.2.1.). Mit dieser Gleichung ließ sich die in den Experimenten beschriebene Versuchsreihe zur Bestimmung des K_M -Wertes für Z-Phe-Arg-AMC wesentlich besser beschreiben als mit der einfachen Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 4). Da es in unseren Experimenten bei allen drei untersuchten Substraten zu einem Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit kam, muss ein Mechanismus wie in Schema 4 skizziert, angenommen werden. Schema 5 illustriert anschaulich einen möglichen Mechanismus. Da viele Proteasen ein aktives Zentrum mit mehreren Bindungsorten aufweisen (Schechter and Berger 1967), besteht generell die Möglichkeit einer fehlerhaften Einlagerung der kurzen fluorogenen Substrate in dieses aktive Zentrum. Das Ausmaß, in dem eine solche Falscheinlagerung geschieht, wird von der Struktur der Seitenketten im aktiven Zentrum beeinflusst und ist somit bei den einzelnen Enzymen verschieden (Coulombe, Grochulski et al. 1996). Das häufig genutzte Lösungsmittel DMSO kann das Ausmaß der Substrathemmung entscheidend beeinflussen. Je höher die DMSO-Konzentration, desto mehr wird der Aktivitätsabfall in der Michaelis-Menten-Darstellung zu so hohen Substratkonzentrationen verschoben, die praktisch bedeutungslos sind und folglich gar nicht erst vermessen werden. Auch das führt vermutlich dazu, dass nur selten über

Substrathemmungen berichtet wird. Im eigenen Labor wurde kürzlich bei kritischer Auswertung von Michaelis- Menten- Plots zur K_M - Bestimmung von H-Arg-AMC gegenüber Cathepsin H ein schwacher Hemmeffekt dieses Substrates im Konzentrationsbereich $> 5 \cdot K_M$ festgestellt (Schilling, persönliche Mitteilung).

Fasst man alle Experimente mit den drei fluorogenen Peptidsubstraten vergleichend zusammen, ergeben sich folgende Schlussfolgerungen:

1. Z-Phe-Arg-AMC führt zu einer ausgeprägten Substrathemmung. Bei 20 °C und geringer DMSO- Konzentration liegen die Schätzwerte für K_M und K_i fast in der gleichen Größenordnung, der Einfluss der Substrathemmung ist unter diesen Bedingungen keinesfalls zu vernachlässigen, die Bestimmung der Parameter ist zum Teil nur unsicher möglich.
2. Z-Leu-Arg-AMC hat die höchste Affinität zum Cathepsin K (Abbildung 11). Die Substrathemmung ist deutlich geringer als bei Z-Phe-Arg-AMC, zwischen K_M und K_i liegt mindestens eine Größenordnung. Z-Leu-Arg-AMC wird von Cathepsin K mit etwa der gleichen katalytischen Konstante (k_{cat}) umgesetzt wie Z-Phe-Arg-AMC. Wegen der etwa um den Faktor 5 kleineren K_M - Werte ergibt sich aber das mit Abstand beste Verhältnis k_{cat} / K_M . In der Summe hat Z-Leu-Arg-AMC die günstigsten Eigenschaften der drei untersuchten Substrate, so dass es das Standardsubstrat bei der fluorometrischen Aktivitätsmessung von Cathepsin K werden sollte.
3. Z-Val-Arg-AMC hat nur eine geringe Affinität zum Cathepsin K. In dem für Routinemessungen üblichem Konzentrationsbereich bis etwa 75 μM ist die Abweichung von der normalen Michaelis- Menten- Kinetik zu vernachlässigen, erst in höheren Konzentrationsbereichen wird auch bei diesem Substrat eine schwache inhibierende Wirkung auf Cathepsin K erkennbar. Das ist der einzige Vorteil, der sich bei Verwendung dieses Substrates ergeben würde.
4. DMSO hat einen hemmenden Einfluss sowohl auf die produktive als auch auf die nichtproduktive Bindung der Substrate. Vermutlich kommt, es basierend auf hydrophoben Wechselwirkungen, zu einer Änderung der Enzym- Substrat- Bindung mit einer Erhöhung von K_M und K_i .

Im Rahmen der Untersuchungen zur Substrathemmung wurde auch die Ionenstärke des Testmediums variiert (Abbildung 13). Solche Untersuchungen können Auskunft über die Art der Wechselwirkungen (hydrophob, elektrostatisch) zwischen Substrat und Enzym geben

und so Rückschlüsse auf die für die Hemmung verantwortlichen Aminosäuren ermöglichen. Zu diesem Problem wurde nur ein Experiment mit Z-Leu-Arg-AMC durchgeführt, das allenfalls einen geringfügigen Einfluss der Ionenstärke vermuten lässt: 400 mM NaCl könnte zu einer besseren Bindung des Substrates in der produktiven Orientierung führen (der K_M -Wert wird kleiner und der K_i -Wert größer). Das ließ sich jedoch statistisch nicht absichern, denn beide 95 %-Konfidenzintervalle überlappen sich. Aus diesem Grund wären Schlussfolgerungen aus diesem Experiment spekulativ. Vergleichbare, weitergehende Untersuchungen zum Feinmechanismus der Substrathemmung erscheinen aber durchaus interessant.

Wie bereits mehrfach erwähnt, ermöglichte die pH-Abhängigkeit der Inhibition bei Cathepsin S die Aktivitätsmessung in Gegenwart des Propeptids (Pietschmann, Fehn et al. 2002). Auch für die Cathepsine B und L, insbesondere aber für Cathepsin K war eine ähnliche pH-Abhängigkeit der Propeptidinhibition schon beschrieben worden (Fox, de Miguel et al. 1992; Carmona, Dufour et al. 1996; Billington, Mason et al. 2000). Die eigenen Untersuchungen zu diesem Problem legen aber die Vermutung nahe, dass Cathepsin K hier die Ausnahme von der Regel darstellt. Eine pH-Erniedrigung von 6,0 auf 4,0 ergab einem Anstieg des K_i um weniger als eine Größenordnung von 0,27 nM auf 2,1 nM (Abbildung 18, Tabelle 2). Diese Diskrepanz zu den publizierten Werten war überraschend und erforderte kritische Kontrollen. Für die Korrektheit dieser Ergebnisse spricht, dass diese durch wiederholte Messungen im Abstand von ca. zwei Jahren mit zwei unabhängig voneinander exprimierten Propeptid-Chargen erhalten wurden. Eine mögliche Ursache der Unterschiede könnte in der ausgeprägten Bindung des Propeptids an Kunststoffoberflächen liegen (Abbildung 20). Dieses Phänomen ist hinlänglich bekannt, wird aber nicht immer bedacht (Rudolph, Böhm et al. 1997). Aus diesem Grund wurden alle unsere Experimente zur Bestimmung des K_i in Glasküvetten durchgeführt, die Propeptidlösungen wurden in Glasgefäßen hantiert und die Pipettenspitzen wurden durch mehrmaliges Vorspülen mit der Propeptidlösung abgesättigt. Die Nutzung des beim Cathepsin S bewährten Verfahrens der alleinigen pH-Wert-Senkung zur Messung des Renaturierungserfolges in Gegenwart des Propeptides war also beim Cathepsin K nicht möglich.

Da die bisher untersuchten Propeptide reversibel an das aktive Zentrum ihrer Mutterenzyme binden (Volkel, Kurz et al. 1996; Maubach, Schilling et al. 1997; Visal, Taylor et al. 1998; Billington, Mason et al. 2000; Guay, Falgouty et al. 2000), besteht die prinzipielle Möglichkeit, durch Erhöhung der Substratkonzentration das Propeptid kompetitiv vom aktiven Zentrum zu verdrängen. Die fluorogenen Substrate waren wegen der Substrathem-

mung für dieses Vorgehen allerdings nicht nutzbar. Die Alternative war die Suche nach Proteinsubstraten, die vom Cathepsin K mit hoher Affinität gebunden und umgesetzt werden. Die Suche nach solchen Substraten war letztlich nicht erfolgreich. Azocasein, Albumin und Lysozym sind nicht ausreichend affin. Prionex[®], ein Kollagenhydrolysat, wird zwar sehr gut gebunden, aber nur extrem langsam umgesetzt. Prionex[®], in der Literatur als Enzymstabilisator alternativ zu BSA empfohlen (Gaffney, Edgell et al. 1996), ist deshalb auch zu diesem Zweck in Verbindung mit Cathepsin K nicht zu verwenden.

Damit war für das in der Zielstellung aufgelistete Spektrum an Methoden ohne separaten Trennschritt gezeigt worden, dass sie alle nicht geeignet sind, um Cathepsin K- Aktivität mit ausreichender Empfindlichkeit in Gegenwart des Propeptids zu messen. Bei den alternativ in Betracht gezogenen Methoden mit Trennschritt wurden zwei Möglichkeiten experimentell geprüft: die Trennung von Propeptid und Enzym nach dem Molekulargewicht und die Zerstörung des Propeptids, einmal durch Cathepsin K selbst, zum anderen durch Pepsin.

Eine Trennung mittels Microcon[®]-Konzentrierungshülsen aufgrund der Molekulargewichtsunterschiede wäre sehr einfach durchführbar gewesen, im Erfolgsfall hätte sich im Retirat der Enzym- Propeptid- Komplex konzentriert, während das freie Propeptid durch die Membran ins Filtrat gelangen sollte. Es wurden Membranen mit unterschiedlichen Porengrößen getestet und festgestellt, dass das Propeptid selbst die Membran mit einer nominellen Porengröße von 100 kDa nicht passieren konnte (Abbildung 27). Diese Beobachtung war dann doch etwas überraschend, passt aber zum Ergebnis einer diesbezüglichen Literaturrecherche, die keine Treffer zur erfolgreichen Trennung von Proteinen mit Konzentrierungshülsen ergab.

Die Autoaktivierung der inaktiven Precursorproteine von Cysteinproteinasen der Papain-Familie zu den reifen Enzymen (Papain, Cathepsine B, K, L und S) ist vielfach beschrieben worden (Vernet, Tessier et al. 1990; Brömme, Bonneau et al. 1993; Bossard, Tomaszek et al. 1996; McQueney, Feild et al. 1998; Brömme, Nallaseth et al. 2004). Die einzigen Enzyme, bei denen dies nicht beobachtet wurde, waren die Cathepsine X (Nagler, Zhang et al. 1999) und C (Dahl, Halkier et al. 2001). Beide benötigen zur Aktivierung den Zusatz einer Protease. Der Prozess der Aktivierung ist oft ein langwieriger Vorgang, der sich durch pH-Erniedrigung, Pepsinzusatz und / oder Temperaturerhöhung beschleunigen lässt (Brömme, Okamoto et al. 1996; Linnevers, McGrath et al. 1997; Hou, Brömme et al. 1999; Brömme, Nallaseth et al. 2004). McQueney und Mitarbeiter beschreiben eine Methode zur Autoaktivierung von Procathepsin K (McQueney, Amegadzie et al. 1997). Durch Inkubation des Precursorproteins bei pH 4,0 und 4 °C kam es spontan zur Aktivierung des Enzyms, getriggert durch den Zusatz von Spuren von reifem Cathepsin K. Veröffentlichungen zum Abbau von

Propeptiden in *trans*- Experimenten, d.h. Enzym und Propeptid sind nicht- kovalent miteinander verbunden und letzteres liegt im großem Konzentrationsüberschuss vor, fanden sich in der Literatur nicht. Am nächsten an unserem Problem lag die von McQueney und Mitarbeitern beschriebene Aktivierungsmethode. Davon ausgehend wurde die Kinetik des Propeptidabbaus durch das Mutterenzym bei pH 4,0 und unterschiedlichen Temperaturen untersucht (Abbildung 28). Es wurde festgestellt, dass es im Verlauf von Stunden mit zunehmender Konzentration an freiem Enzym bei diesem pH auch zu einer zunehmenden Zerstörung oder Inaktivierung des Enzyms selbst kommt. Das Verfahren funktionierte im Prinzip, war aber nicht standardisierbar. Vermutlich hat die unbekannte Anfangskonzentration an freiem Enzym einen entscheidenden Einfluss auf den Zeitverlauf der gemessenen Enzymaktivität. Der qualitative Nachweis von renaturiertem Cathepsin K wäre mit dieser Methode also durchführbar, eine Quantifizierung der Renaturierung ist damit aber nicht möglich.

Wie bereits erwähnt, finden sich in der Literatur zahlreiche Hinweise auf die Prozessierung von Precursorproteinen mit Proteasen, insbesondere mit Pepsin (Brömme, Okamoto et al. 1996; Linnevers, McGrath et al. 1997; Hou, Brömme et al. 1999; Brömme, Nallaseth et al. 2004). Voruntersuchungen zeigten, dass Pepsin weder das fluorogene Substrat Z-Leu-Arg-AMC hydrolysiert, noch das reife Cathepsin K zerstört. Pepsinzusatz führte aber eindeutig zu einer rasch nachlassenden Hemmwirkung des Propeptids, vermutlich zu dessen Zerstörung. In der Literatur fanden sich Angaben von 0,555 μM (Linnevers, McGrath et al. 1997; Hou, Brömme et al. 1999) bis 16,6 μM Pepsin (Brömme, Nallaseth et al. 2004), die zur Prozessierung von Procathepsin K eingesetzt wurden. Wir begannen mit sehr kleinen Pepsinkonzentrationen von 1 nM, diese mussten aber im Verlauf der Optimierung des Verfahrens bezüglich Ausbeute, Reproduzierbarkeit und Praktikabilität erheblich gesteigert werden. Nur mit Pepsin- Konzentrationen von 75 μM und 100 μM wurden akzeptable Wiederfindungsraten erreicht. Das war etwas überraschend, denn diese Konzentrationen waren höher als die des abzubauenen Propeptides. Deshalb wurde mit dem pepsinspezifischen chromogenen Substrat die Aktivität der beiden genutzten Pepsin- Chargen, einer älteren und einer neuen des gleichen Herstellers, gemessen. Die experimentell ermittelte Pepsinkonzentration stimmte gut mit der errechneten überein (Abbildung 3). Die Wirksamkeit beider Chargen beim Propeptid- Abbau war vergleichbar. Weitere Untersuchungen zu diesem speziellen Aspekt wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Den Ausgangspunkt für das sehr spezielle Thema dieser Promotionsarbeit wurde am Anfang der Diskussion noch einmal zusammengefasst, denn nur bei Kenntnis der generellen Fragestellung wird die Zielstellung der vorliegenden Arbeit verständlich. Trotz sachgemäßer Recherche erwies sich das methodische Konzept der geplanten Untersuchungen zum Nachweis der Foldasefunktion des Propeptids vom Cathepsin K als nicht realisierbar. Statt ein bewährtes Verfahren auf ein neues Problem anzuwenden, standen wir plötzlich vor der Aufgabe, ein neues Messverfahren zur Bestimmung von Cathepsin K- Aktivität nach Komplexbildung mit dem Propeptid in Renaturierungsansätzen zu entwickeln. Wir stellten fest, dass der Abbau des Propeptids durch Pepsin dazu das günstigste Verfahren ist. Dieses Verfahren hat sich in der Laborpraxis bewährt, es wurde in modifizierter Form inzwischen auch bei anderen Enzymen eingesetzt. Darüber hinaus wurden zwei grundsätzliche Aspekte bei der Arbeit mit Cathepsin K detailliert untersucht, der fluorometrische Aktivitätstest mit AMC- Substraten und die Inhibitionskinetik zwischen Cathepsin K und seinem Propeptid. Diese Ergebnisse wurden in Posterbeiträgen zu zwei internationalen Kongressen zu Proteolytischen Enzymen den interessierten Forschern vorgestellt.

6.) Literaturverzeichnis

Atley, L., J. Mort, et al. (2000). "Proteolysis of human bone collagen by cathepsin K: characterization of the cleavage sites generating by cross-linked N-telopeptide neoepitope." Bone. **26(3)**: 241-247.

Baici, A. (1986). "Hysteretic Enzyme Response Induced by Inhibitory Antibodies against Human Leukocyte Elastase." Biol Chem. Hoppe- Seyler **367**: 245-58.

Bartlett, P. A. and C. K. Marlowe (1987). "Possible role for water dissociation in the slow binding of phosphorus-containing transition-state-analogue inhibitors of thermolysin [published erratum appears in Biochemistry 1988 Nov 15;27(23):8694]." Biochemistry **26(26)**: 8553-61.

Billington, C. J., P. Mason, et al. (2000). The Slow-Binding Inhibition of Cathepsin K by Its Proptide. Biochem Biophys Res Commun. **276**: 924-929.

Bossard, M. J., T. A. Tomaszek, et al. (1996). "Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification." J Biol Chem. **271(21)**: 12517-12524.

Brömme, D., P. R. Bonneau, et al. (1993). "Functional expression of human cathepsin S in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization of the recombinant enzyme." J Biol Chem. **268(7)**: 4832-8.

Brömme, D., F. S. Nallaseth, et al. (2004). "Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases." Methods (Duluth). **32(2)**: 199-206.

Brömme, D. and K. Okamoto (1995). "Human cathepsin O2, a novel cysteine protease highly expressed in osteoclastomas and ovary molecular cloning, sequencing and tissue distribution." Biol Chem. **376(6)**: 379-84.

- Brömme, D., K. Okamoto, et al. (1996). "Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme." J Biol Chem. **271**(4): 2126-32.
- Bryan, P., L. Wang, et al. (1995). "Catalysis of a protein folding reaction: mechanistic implications of the 2.0 Å structure of the subtilisin-prodomain complex." Biochemistry **34**(32): 10310-8.
- Carmona, E., E. Dufour, et al. (1996). "Potency and selectivity of the cathepsin L propeptide as an inhibitor of cysteine proteases." Biochemistry **35**(25): 8149-57.
- Chapman, R. L., S. E. Kane, et al. (1997). "Abnormal glycosylation of procathepsin L due to N-terminal point mutations correlates with failure to sort to lysosomes." J Biol Chem. **272**(13): 8808-16.
- Cleland, W. W. (1979). Initial Rate and Inhibitor Methods, Section 2: Substrate Inhibition. Enzyme kinetics and mechanism. D. L. Purich. New York, Academic Press. **63**.
- Coulombe, R., P. Grochulski, et al. (1996). "Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment." EMBO J **15**(20): 5492-503.
- Coulombe, R., Y. Li, et al. (1996). "Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of human procathepsin L." Proteins **25**(3): 398-400.
- Cunningham, E. L., S. S. Jaswal, et al. (1999). "Kinetic stability as a mechanism for protease longevity." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 11008-14.
- Cygler, M. and J. S. Mort (1997). "Proregion structure of members of the papain superfamily. Mode of inhibition of enzymatic activity." Biochimie **79**(11): 645-52.
- Dahl, S. W., T. Halkier, et al. (2001). "Human recombinant pro-dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) can be activated by cathepsins L and S but not by autocatalytic processing." Biochemistry. **40**(6): 1671-8.

Drake, F. H., R. A. Dodds, et al. (1996). "Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts." J Biol Chem. **271**(21): 12511-6.

Dunn, B. M., M. Jimenez, et al. (1986). "A systematic series of synthetic chromophoric substrates for aspartic proteinases." Biochem J. **237**(3): 899-906.

Eder, J., M. Rheinhecker, et al. (1993). "Folding of subtilisin BPN': role of the pro-sequence." J Mol Biol. **233**(2): 293-304.

Fox, T., E. de Miguel, et al. (1992). Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide. Biochemistry. **31**: 12571-6.

Friel C. T., A. P. Capaldi ., et al. (2003). "Structural Analysis of the Rate- limiting Transition States in the Folding of Im 7 and Im 9: Similarities and Differences in the Folding of Homologous Proteins." J Mol Biol. **326**(1): 293-305.

Fujita, Y., K. Nakata, et al. (2000). "Novel mutations of the cathepsin K gene in patients with pycnodysostosis and their characterization." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. **85**(1): 425-31.

Gaffney, P. J., T. A. Edgell, et al. (1996). "A pig collagen peptide fraction. A unique material for maintaining biological activity during lyophilization and during storage in the liquid state." Journal of Pharmacy & Pharmacology. **48**(9): 896-8.

Garnero, P., O. Borel, et al. (1998). "The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases." J Biol Chem. **273**(48): 32347-52.

Gelb, B. D., G. P. Shi, et al. (1996). "Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency." Science. **273**(5259): 1236-8.

Gowen, M., F. Lazner, et al. (1999). "Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralization." J Bone Miner Res. **14**(10): 1654-63.

Guay, J., J. Falgueyret, et al. (2000). "Potency and selectivity of inhibition of cathepsin K, L and S by their respective propeptides." Eur J Biochem. **267**.

Hou, W. S., D. Brömme, et al. (1999). "Characterization of novel cathepsin K mutations in the pro and mature polypeptide regions causing pycnodysostosis." J Clin Invest. **103**(5): 731-8.

Hou, W. S., W. Li, et al. (2002). "Comparison of cathepsins K and S expression within the rheumatoid and osteoarthritic synovium." Arthritis Rheum **46**(3): 663-74.

Hummel, K. M., P. K. Petrow, et al. (1998). "Cysteine proteinase cathepsin K mRNA is expressed in synovium of patients with rheumatoid arthritis and is detected at sites of synovial bone destruction." J Rheum. **25**(10): 1887-94.

Inaoka, T., G. Bilbe, et al. (1995). "Molecular cloning of human cDNA for cathepsin K: novel cysteine proteinase predominantly expressed in bone." Biochem Biophys Res Commun. **206**(1): 89-96.

Inouye, M. (1991). "Intramolecular chaperone: the role of the pro-peptide in protein folding. [Review] [20 refs]." Enzyme. **45**(5-6): 314-21.

Kafienah, W., D. Brömme, et al. (1998). "Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix." Biochem J. **331**: 727-31.

Karrer, K. M., S. L. Peiffer, et al. (1993). "Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(7): 3063-7.

Kaulmann, G. (2002). The crystal structure of human procathepsin S wild type [Dissertation]. Jena, Friedrich- Schiller- Universität.

Kawabata, T., Y. Nishimura, et al. (1993). "Purification and processing of rat liver procathepsin B." J Biochem (Tokyo) **113**(3): 389-94.

Kirschke, H., A. J. Barrett, et al. (1995). "Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. [Review] [1237 refs]." Protein Prof. **2**(14): 1581-643.

Kreusch, S., M. Fehn, et al. (2000). "An evolutionarily conserved tripartite tryptophan motif stabilizes the prodomains of cathepsin L-like cysteine proteases." Eur J Biochem **267**(10): 2965-72.

LaLonde, J. M., B. Zhao, et al. (1999). "The crystal structure of human procathepsin K." Biochemistry **38**(3): 862-9.

Lecaille, F., J. Kaleta, et al. (2002). "Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. [Review] [375 refs]." Chem Rev. **102**(12): 4459-88.

Li, Y., Z. Hu, et al. (1995). "Functional analysis of the propeptide of subtilisin E as an intramolecular chaperone for protein folding. Refolding and inhibitory abilities of propeptide mutants." J Biol Chem. **270**(42): 25127-32.

Linnevers, C. J., M. E. McGrath, et al. (1997). "Expression of human cathepsin K in *Pichia pastoris* and preliminary crystallographic studies of an inhibitor complex." Protein Sci. **6**(4): 919-21.

Mason, R. W., S. Gal, et al. (1987). "The identification of the major excreted protein (MEP) from a transformed mouse fibroblast cell line as a catalytically active precursor form of cathepsin L." Biochem J **248**(2): 449-54.

Maubach, G., K. Schilling, et al. (1997). "The inhibition of cathepsin S by its propeptide--specificity and mechanism of action." Eur J Biochem **250**(3): 745-50.

McGrath, M. E., P. A. Sprengeler, et al. (2003). "Peptide ketobenzoxazole inhibitors bound to cathepsin K." Biochemistry. **42**(51): 15018-28.

McIntyre, G. F., G. D. Godbold, et al. (1994). "The pH-dependent membrane association of procathepsin L is mediated by a 9-residue sequence within the propeptide." J Biol Chem. **269**(1): 567-72.

McQueney, M. S., B. Y. Amegadzie, et al. (1997). "Autocatalytic activation of human cathepsin K." J Biol Chem. **272**(21): 13955-60.

McQueney, M. S., J. Feild, et al. (1998). "Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) cathepsin K: cloning, expression, purification, and activation." Protein Expr. Purif. **14**(3): 387-94.

Moss, M. M., J. Kuzmic, et al. (1996). "Inhibition of Human Steroid 5 α Reductases type I and II by 6-Aza-Steroids: Structural Determinants of One- Step vs. Two- Step Mechanism." Biochemistry **35**: 3457-64.

Nagler, D. K., R. Zhang, et al. (1999). "Human cathepsin X: A cysteine protease with unique carboxypeptidase activity." Biochemistry. **38**(39): 12648-54.

Nielsen P. M., D. Petersen, et al. (2001). "Improved method for determining food protein degree of hydrolysis." J Food Sci. **66**(5): 642-646.

Nishimura, Y., T. Kawabata, et al. (1988). "Identification of latent procathepsins B and L in microsomal lumen: characterization of enzymatic activation and proteolytic processing in vitro." Arch Biochem Biophys **261**(1): 64-71.

Nishimura, Y., T. Kawabata, et al. (1989). "Evidence that aspartic proteinase is involved in the proteolytic processing event of procathepsin L in lysosomes." Arch Biochem Biophys **271**(2): 400-6.

Nissler, K., S. Kreusch, et al. (1998). "Sorting of non-glycosylated human procathepsin S in mammalian cells." Biol Chem. **379**(2): 219-24.

Nomura, T. and Y. Fujisawa (1997). "Processing properties of recombinant human procathepsin L." Biochem Biophys Res Commun **230**(1): 143-6.

Ogino, T., T. Kaji, et al. (1999). "Function of the propeptide region in recombinant expression of active procathepsin L in Escherichia coli." J Biochem Tokyo **126**(1): 78-83.

Pietschmann, S. (2002). Die Foldasefunktion des Propeptids des humanen Cathepsin S [Dissertation]. Jena, Friedrich- Schiller- Universität.

Pietschmann, S., M. Fehn, et al. (2002). "Foldase function of the cathepsin S proregion is strictly based upon its domain structure." Biol Chem. **383**(9): 1453-8.

Rudolph, R., G. Böhm, et al. (1997). Folding Proteins. Protein Function. T. E. Creighton. New York, Oxford University Press.

Salvati, L., M. Mattu, et al. (2001). "Modulation of the catalytic activity of cruzipain, the major cysteine proteinase from Trypanosoma cruzi, by temperature and pH." Eur J Biochem. **268**(11): 3253-8.

Sandoval, I. V. and O. Bakke (1994). "Targeting of membrane proteins to endosomes and lysosomes. [erratum appears in Trends Cell Biol. 1994 Oct;4(10):377]." Trends in Cell Biology. **4**(8): 292-7.

Sarat G., de la Motte R. et al. (1994). Protease Assay Methods. New York, Oxford University Press.

Schechter, I. and A. Berger (1967). "On the size of the active site in proteases. I. Papain." Biochem Biophys Res Commun. **27**(2): 157-62.

Schellenberger, A. and B. Fischer (1989). Substratüberschusshemmung. Enzymkatalyse. Berlin, Springer Verlag.

Schilling, K., S. Pietschmann, et al. (2001). "Folding incompetence of cathepsin L- like cysteine proteases may be compensated by the highly conserved, domain-building N-terminal extension of the proregion." Biol. Chem. **382**(May 2001): 859-865.

Schlabrakowski, A. (2003). Spezifität der Inhibition von Cathepsin L- ähnlichen Cysteinproteasen mit ihren Propeptiden [Dissertation]. Jena, Friedrich- Schiller- Universität.

Shinde, U. and M. Inouye (1996). "Propeptide-mediated folding in subtilisin: the intramolecular chaperone concept." Adv Exp Med Biol **379**: 147-54.

Silverman, R. (2002). Enzyme Kinetics- Substrate Inhibition. The Organic Chemistry of Enzyme- Catalyzed Reactions. San Diego, Academic Press.

Smith, S. M. and M. M. Gottesman (1989). "Activity and deletion analysis of recombinant human cathepsin L expressed in Escherichia coli." J Biol Chem **264**(34): 20487-95.

Sohl, J. L., S. S. Jaswal, et al. (1998). "Unfolded conformations of alpha-lytic protease are more stable than its native state." Nature **395**(6704): 817-9.

Stein, R. L., F. Melandri, et al. (1996). "Kinetic Characterization of the Chymotryptic Activity of the 20S Proteasome." Biochemistry **35**: 3899-908.

Tao, K., N. A. Stearns, et al. (1994). "The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit." Arch Biochem Biophys **311**(1): 19-27.

Tezuka, K., Y. Tezuka, et al. (1994). "Molecular cloning of a possible cysteine proteinase predominantly expressed in osteoclasts." J Biol Chem. **269**(2): 1106-9.

Venäläinen, J. I., R. O. Juvonen, et al. (2002). "Substrate-dependent, non-hyperbolic kinetics of pig brain prolyl oligopeptidase and its tight binding inhibition by JTP-4819." Biochem Pharm. **64**(3): 463-71.

Vernet, T., D. C. Tessier, et al. (1990). Secretion of functional papain precursor from insect cells. Requirement for N-glycosylation of the pro-region. J Biol Chem. **265**: 16661-6.

Vijayalakshmi, J., M. Mukherjee, et al. (2001). "The 2.2 Å crystal structure of Hsp33: a heat shock protein with redox-regulated chaperone activity." Structure. **9**(5): 367-75.

Visal, S., M. A. Taylor, et al. (1998). The proregion of papaya proteinase IV inhibits Colorado potato beetle digestive cysteine proteinases. FEBS Letters. **434**: 401-405.

- Volkel, H., U. Kurz, et al. (1996). Cathepsin L is an intracellular and extracellular protease in *Paramecium tetraurelia*. Purification, cloning, sequencing and specific inhibition by its expressed propeptide. Eur J Biochem. **238**: 198-206.
- Wang, B., G. P. Shi, et al. (1998). "Human cathepsin F. Molecular cloning, functional expression, tissue localization, and enzymatic characterization." J Biol Chem. **273**(48): 32000-8.
- Wang, L., S. Ruvinov, et al. (1995). Prodomain mutations at the subtilisin interface: correlation of binding energy and the rate of catalyzed folding. Biochemistry. **34**: 15415-20.
- Wex, T., B. Levy, et al. (1999). "Human cathepsins F and W: A new subgroup of cathepsins." Biochem Biophys Res Commun **259**(2): 401-7.
- Wiederanders, B. and H. Kirschke (1989). "The processing of a cathepsin L precursor in vitro." Arch Biochem Biophys **272**(2): 516-21.
- Wiederanders, B., H. Kirschke, et al. (1986). "The azocasein- urea- pepstatin assay discriminates between lysosomal proteinases." Biomed Biochim Acta **45**: 1477-83.
- Yamamoto, Y., S. Watabe, et al. (1999). "Proregion of *Bombyx mori* cysteine proteinase functions as an intramolecular chaperone to promote proper folding of the mature enzyme." Arch Insect Biochem Physiol **42**(3): 167-78.
- Zhang, J. X., I. Braakman, et al. (1997). "Quality control in the secretory pathway: the role of calreticulin, calnexin and BiP in the retention of glycoproteins with C-terminal truncations." Mol Biol Cell. **8**(10): 1943-54.

Danksagung

Abschließend möchte ich allen danken, die mich unterstützt haben und so zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. B. Wiederanders danke ich für die Überlassung des Themas, für die Herausforderung, für seinen wissenschaftlichen Rat und kritische und produktive Hinweise sowohl auf experimentellem Gebiet als auch bei der Ausfertigung der schriftlichen Arbeit und für jederzeitige Gesprächsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. K. Schilling für die exzellente Betreuung. Er hatte stets ein offenes Ohr für meine Fragen, stand mir im Labor bei der Durchführung der Experimente und der Interpretation der Ergebnisse zur Seite, war jederzeit zu Diskussionen bereit und gab wertvolle Hinweise beim Verfassen des schriftlichen Teils der Arbeit.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Brömme, der uns freundlicherweise das rekombinante Cathepsin K zur Verfügung stellte, sowie Frau A. Kreusch und der ehemaligen Doktorandin A. Schlabrakowski für die Herstellung des Cathepsin K- Propeptids..

Ich danke Herrn Dr. Cumme für die Gesprächsbereitschaft bei mathematischen Fragestellungen und die Unterstützung bei der Auswertung der Versuchsreihen mit Easy Fit.

Ich danke auch Frau E. Dimmig, die mir bei der Durchführung der Experimente mit Rat und Tat zur Seite stand.

Allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Biochemie I danke ich für die gute und herzliche Zusammenarbeit. .

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Ramona Kleint, geboren am 07.07.1979 in Sonneberg, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich- Schiller- Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. B. Wiederanders und Dr. K. Schilling, Dr. Cumme,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und das Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwertige Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Lindenberg, 20.07.2004

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Kleint
Vorname:	Ramona
Wohnanschrift	Neuhäuser Str. 9 96524 Lindenberg
Geburtsdatum / -ort:	07.07.1979, Sonneberg
Familienstand:	ledig

Schulbildung:

09/1986 – 07/1991	Schulbildung in der Grundschule und Regelschule Neuhaus-Schierschnitz
08/1991 – 07/1998	Besuch des Gymnasiums Sonneberg, Abschluss: Abitur

Hochschulbildung:

Seit Oktober 1998	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Abschluss des Studiums voraussichtlich im Dezember 2004
Seit Oktober 2001	Mitarbeit am Institut für Biochemie der Friedrich-Schiller- Universität Jena bei Prof. Dr. B. Wiederanders mit dem Ziel Promotion

Lindenberg, 20.07.2004